

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı**

**VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRELERİNDE RAS
TRANSFEKSİYONU SONRASINDA ANJİYOTENSİN
II UYARIMINDA İNTERFERON- γ İLE
OLUŞTURULAN APOPTOZİSTE AKT'NİN ROLÜ**

Alper TOKAY

Doktora Tezi

Antalya, 2009

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı**

**VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRELERİNDE RAS
TRANSFEKSİYONU SONRASINDA ANJİYOTENSİN
II UYARIMINDA İNTERFERON- γ İLE
OLUŞTURULAN APOPTOZİSTE AKT'NİN ROLÜ**

Alper TOKAY

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2007.03.0122.002)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince “Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği” ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşığıdadır (orijinali ekte sunulmuştur).

1. Tokay A, Raymondjean M, Alıcıgüzel Y. The Effect of Thyroid Hormones on Erythrocyte 2,3-Diphosphoglycerate. *The Endocrinologist* 2006;16: 57–60.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından, Biyokimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. /...../2009

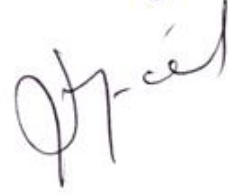
Tez Danışmanı :

Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



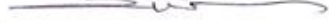
Üye:

Prof. Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Üye:

Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



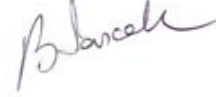
Üye:

Prof. Dr. Aslı BAYKAL ATAMAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Üye:

Doç. Dr. Banu SANCAK
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../.....tarih ve/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Angiotensin II'nin (Ang II) hem apoptotik hem de anti-apoptotik sinyal mekanizmaları üzerinde etkili olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Vasküler düz kas hücrelerinde (VDKH) anti-apoptotik etkilerini Akt/protein kinaz B (PKB) üzerinden gösterdiği de bilinmektedir. Bununla birlikte, aktive olmuş fosforile Akt'nin hücre içinde aktivasyonunu sağladığı birçok alt sinyalizasyon yolları arasında IKK (NF- κ B – hücre yaşamsallığı), p70S6K (protein sentezi) gibi yolların yanı sıra, mitokondriyal proteinlerden Bad, Bcl-2 gibi aktivatörler üzerinden apoptozisi tetiklediği de gösterilmiştir.

Literatürdeki çalışmalarda gözlemlediğimiz bu ikilem ve çelişki; Akt'nin hem hücre yaşamsallığında hem de apoptoziste rolünün olması, bu molekülün onkogenik şartlarda da hücreyi apoptozise götüren bir hedef molekül olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda, VDKH'lerinde, Ang II uyarımına bağlı olarak Akt fosforilasyonuna hangi ulaklar üzerinden erişildiği ve özellikle apoptozis için bir kavşak proteini olduğunu gösterebilmek amacıyla, primer VDKH kültüründe Akt fosforilasyon düzeylerini, aynı hücre kültüründe interferon- γ uyarımlı apoptotik şartlarda da gözlenmiştir. Bununla birlikte, Ras miktarının fazla olduğu VDKH'lerinde interferon- γ ile apoptotik sinyalizasyon yollarının aktive olduğu durumlarda Akt fosforilasyon düzeyleri kıyaslanmıştır. Ras'ın fazlasıyla yoğun olduğu ve normal hücrelerde olası Akt fosforilasyonunun etkilediği aşağı efektör molekülleri ile etkileşimini gözlemleyebilmek amacıyla Bad ve Bcl-X_L immünpresipitasyonları ve kaspas III ölçümleri ile apoptotik sinyallerin ne derecede etkilendiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak özellikle apoptozis sinyal yolağı üzerinde Akt/PKB önemli bir kavşak molekül olarak gözlemlenmiştir. Bununla birlikte Ras miktarının arttığı VDKH'lerinde azalmış Akt/PKB fosforilasyonu ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşum düzeyleri, bize Ras miktarının arttığı şartlarda Akt/PKB anti-apoptotik sinyal yolu üzerinde, özellikle Bad/Bcl-XL kompleks oluşumunun miktarının azalması, indüklediğimiz apoptotik ortama katkı yapması beklenirken, apoptotik sinyallerin artışı gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Akt/PKB, Ras, apoptozis, interferon- γ , VDKH.

ABSTRACT

Angiotensin II (Ang II) is related with both signalization mechanisms concerning apoptosis and anti-apoptosis. It is also known that Ang II triggers its anti-apoptotic effects via Akt/protein kinase B (PKB) in vascular smooth muscle cells (VSMCs). In addition, there are many sub signalization pathways, such as IKK (NF- κ B – cell survival) and p70S6K (protein synthesis) which are being triggered over Akt and also it was shown that apoptosis is being induced via such mitochondrial proteins Bad, Bcl-2 by active phosphorylated Akt.

This contradiction, which Akt is having a part in both apoptosis and cell survival, overviewed in the studies, makes us to predict a hypothesis that Akt can be a target molecule, which can take the cell to apoptosis even in Ras over-expressed media.

In our study, as to emphasize that Akt is a junction molecule especially for apoptosis in VSMCs, we have tried to establish a model, after which the cell culture media induced by Ang II, Akt phosphorylation was measured as well as we did the same assays with the same parameters in VSMC culture after being induced by interferon- γ that takes the cells to apoptosis. Besides, phosphorylated Akt levels were observed in such a media, which activated apoptotic signalization pathways via interferon- γ in VSMC culture formed by the transfection of Ras plasmids. Both in Ras over-expressed and normal cells, as to observe interactions between phosphorylated Akt and the sub-effector molecules such as Bad and Bcl-X_L, the immunoprecipitation assays were carried out and by doing caspas-3 assays the level of apoptotic signals have been demonstrated in Ras over-expressed VSMC culture.

Briefly, what we have showed is that the Akt/PKB is a junction molecule and especially plays an individual role on going apoptosis in VSMCs. On the other hand, decreased levels of Akt/PKB phosphorylation and Bad/Bcl-X_L complex formation, emphasized the possible apoptotic mechanisms in Ras over-expressed media can easily be manipulated, but the resident fact is just the direct contrary.

Keywords: Akt/PKB, Ras, apoptosis, interferon- γ , VSMC.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması ve gerçekleştirilmesinde değerli zamanını ve yardımlarını esirgemeyen proje yürütücüm ve akademik danışmanım Sayın Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA başta olmak üzere tüm bölüm hocalarıma,

Bu araştırmaya olan desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Uğur YAVUZER'e,

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesi sırasında değerli zamanlarını ve emeklerini harcayan Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA'nın danışmanlığı altındaki tüm ekip arkadaşlarıma,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

Sınırsız desteği ve göstermiş olduğu sonsuz sabrı için Eşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Alper TOKAY

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1 Vasküler Yapı	4
2.2 Anjiyotensin II	5
2.3 Anjiyotensin II Reseptörleri	6
2.3.1 Anjiyotensin Tip I Reseptörleri (AT1)	6
2.3.2 Anjiyotensin Tip II Reseptörleri (AT2)	6
2.4 VDKH'lerinde Ang II Bağımlı Sinyal Yolları	7
2.4.1 VDKH'lerinde Ang II tarafından uyarılan tirozin kinaz yolları; PI3-K ve Akt/protein Kinaz B	9
2.5 Apoptozis	9
2.5.1 Programlanmış Hücre Ölüm Basamakları	10
2.5.2 Hücreyi Apoptozise Götüren Başlıca Etmenler	12
2.5.3 VDKH'lerinde Apoptozis	13
2.6 Ras Proto-Onkogen Ailesi	14
MATERYAL ve METOD	17
3.1 Materyal ve Kimyasal Malzemeler	17
3.2 Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler	18
3.3 Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu	19
3.3.1 Kullanılan Solüsyonlar	19
3.3.2 Metod	20
3.4 Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin Kültürü	21

3.4.1	Kullanılan Solüsyonlar	21
3.4.2	Metod	21
3.5	Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu	22
3.5.1	Hücrelerin İmmünohistokimya Preparatları Haline Getirilmesi	22
3.5.2	Kullanılan Solüsyonlar	23
3.5.3	Metod	23
3.6	VDKH Kültürlerinin Western Blot Analizi için Lizatlarının Hazırlanması	24
3.6.1	Kullanılan Solüsyonlar	24
3.6.2	Kullanılan Aktivatörler	25
3.6.3	Kullanılan İnhibitörler	25
3.6.4	Metod	26
3.7	Protein Miktarının Tayini	27
3.7.1	Mikro BCA (Bisinkoninikası) Deney Kitinin Prensibi	27
3.7.2	Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Grafiğinin Hazırlanması	27
3.7.3	Numunelerin Protein Miktar Tayini	28
3.8	Akt/PKB, Bad ve Ras Fosforilasyonunun ve Bad/Bcl-X _L Kompleks Oluşumunun İmmünpresipitasyon, SDS-PAGE ve Western İmmünoblot Analizi	28
3.8.1	Bad/Bcl-X _L İmmünpresipitasyonu	29
3.8.2	Elektroforez jelinin Hazırlanması	29
3.8.3	Elektroforez İşlemi	32
3.8.4	Elektroforez Jelinin Membrana Aktarılması	32
3.8.5	Membranların Antikorlarla İşaretlenmesi	33
3.8.6	Membrandaki Sinyallerin Filme Aktarılması	34
3.8.7	Sinyallerin Grafik Haline Dönüştürülmesi	35
3.8.9	Membranların İkinci Bir Antikor ile Muamelesi (Stripping)	35
3.9	Primer Vasküler Hücre Kültüründe Apoptozisin Tetiklenmesi ve Ölçüm Metotları	36
3.9.1	“Kaspas-3 Hücrel Aktivite Deney Kiti” ne Göre Spektrofotometrik Kaspas-3 Tayini	36
3.9.2	Anneksin V-FITC Apoptozis Kiti ile Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi	38
3.10	FuGENE HD Transfeksiyon Reaktif i ile Transient (Geçici) Ras Plazmid Transfeksiyonu ve Gösterimi	39
BULGULAR		42
4.1	Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu	42
4.2	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımıyla Akt/PKB Aktivasyonu	43

4.2.1	VDKH'lerinde Ang II Etkisiyle Akt/PKB Doz Bağımlı Fosforilasyonu	43
4.2.2	VDKH'lerinde Ang II Etkisiyle Akt/PKB Süre Bağımlı Fosforilasyonu	44
4.3	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımıyla Bad Aktivasyonu	45
4.3.1	VDKH'lerinde Ang II Etkisiyle Bad Doz Bağımlı Fosforilasyonu	45
4.3.2	VDKH'lerinde Ang II Etkisiyle Bad Süre Bağımlı Fosforilasyonu	46
4.3.3	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımıyla Ras Miktarının Tayini	47
4.3.4	VDKH'lerinde Ang II Etkisiyle Ras Doz Bağımlı Miktarının Belirlenmesi	47
4.3.5	VDKH'lerinde Ang II Etkisiyle Ras Süre Bağımlı Miktarının Belirlenmesi	48
4.4	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımıyla Bad/Bcl-X _L Kompleks Oluşumu	49
4.4.1	VDKH'lerinde Ang II Etkisiyle Bad/Bcl-XL Doz Bağımlı Kompleks Oluşumu	49
4.4.2	VDKH'lerinde Ang II Etkisiyle Bad/Bcl-XL Süre Bağımlı Kompleks Oluşumu	50
4.5	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II'nin AT1 Reseptörü Üzerinden Akt/PKB Fosforilasyonu	51
4.6	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Akt/PKB Uyarımını PI3-K Üzerinden Gerçekleştirmektedir	52
4.7	Ang II Uyarımında Fosforile Proteinler Akt/PKB ve Bad, H-Ras Miktarı ve Bad/Bcl-XL Kompleks Oluşumu Üzerine, PKC İnhibitörü GF109203X, Src İnhibitörü PP2 Ras İnhibitörü FPT III ve spesifik EGF ve PDGF Reseptör Blokörleri Olan AG1478 ve AG1295'in Etkileri	54
4.8	Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Apoptozisin Belirlenmesi ve Ang II'nin Bu Oluşum Üzerine Etkileri	57
4.8.1	"Kaspas-3 Hücrel Aktivite Deney Kiti" ile VDKH'lerinde Apoptozis Sonuçları	58
4.8.2	"Anneksin V-FITC Kiti" ile VDKH'lerinde Apoptozisin Belirlenmesi	60
4.8.3	VDKH'lerinde Ang II Apoptotik Etkilerini AT1R Üzerinden Göstermektedir	61
4.9	VDKH'leri pCH110 DNA'sı ile Transfekte Olmuşlardır	62
4.9.1	VDKH'lerinde c-H-Ras ^{N17} DNA'sının Transfeksiyonu Western-blot Tekniği İle Gösterilmiştir	63
4.9.2	Fazla Miktarda H-Ras ^{N17} Bulunduran VDKH'leri Azalmış Akt Fosforilasyonu ve Bad/Bcl-X _L Kompleks Oluşumuna Sahiptir	64

4.9.3	Anti-Apoptotik Faktör Olarak Bilinen Ang II ile Muamele Edilmiş Fazla Miktarda Ras Bulunduran VDKH'lerinde Akt/PKB Fosforilasyonunda ve Bad/Bcl-X _L Kompleks Oluşumunda Bir Artış Gözlenmedi	65
4.10	Fazla Miktarda Ras İçeren VDKH'lerinde IFN- γ Uyarımlı Oluşturulmaya Çalışılan Apoptozis Başarısız Olmuştur	66
TARTIŞMA		67
SONUÇLAR		74
KAYNAKLAR		77
ÖZGEÇMİŞ		88
EKLER		89
EK-1	“The Effect of Thyroid Hormones on Erythrocyte 2,3-Diphosphoglycerate”	

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
Akt/PKB	: Akt/Protein Kinaz B
Ang I	: Anjiyotensin I
Ang II	: Anjiyotensin II
Ang III	: Anjiyotensin III
Ang IV	: Anjiyotensin IV
APS	: Amonyum Persülfat
AT1R	: Anjiyotensin Tip 1 Reseptörü
AT2R	: Anjiyotensin Tip 2 Reseptörü
BSA	: Sığır Serum Albümin
Ca²⁺	: Kalsiyum
CaCl₂	: Kalsiyum Klorid
cAMP	: siklik Adenozin Monofosfat
CO₂	: Karbondioksit
DFF	: DNA Kırılma Faktörü
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EAS	: Enzim Ayrışma Solüsyonu
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGTA	: Etilenbis(oksietilennitrilo) Tetraasetik Asit
ERK	: Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
ET-1	: Endotelin-1
FADD	: Ölüm Birimi ile Fas-ilişkili Protein
FAK	: Fokal Adezyon Kinazlar
FBS	: Fetal Sığır Serum
FGF-2	: Fibroblast Büyüme Faktörü-2
Grb2	: Büyüme Faktör Reseptörüne-bağlanan Protein 2
GTP	: Guanozin Trifosfat
HBSS	: Hank'in Dengeli Tuz Solüsyonu
HCl	: Hidroklorik Asit
HEPES	: [N-(2-Hidroksietil)piperazin-N'-(2-etansülfonik asit)]
HRP	: Bayırturbu Peroksidaz
ICAD	: Kaspas-uyarımli Deoksiribonükleazlar
IFN-γ	: İnterferon-gama
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IgG	: İmmün Globülin
IL-1	: İnterlökin-1
iNOS	: Uyarılabilir Nitrik Oksit
JNK	: c-Jun N-Terminal Kinaz
KCl	: Potasyum Klorür
KH₂PO₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
MAP	: Mitojen Aktivele Protein

MAPK	: Mitojen-uyarımli Protein Kinaz
Mg²⁺	: Magnezyum
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
Na₂HPO₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
Na₃VO₄	: Sodyum orto-Vanadat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaF	: Sodyum Florür
NO	: Nitrik Oksit
PARP	: Poli(ADP)riboz Polimeraz
PDGF-BB	: Platelet Türevli Büyüme Faktörü-BB
PI3-K	: Fosfatidil İnozitol 3-Kinaz
PKC	: Protein Kinaz C
PLA₂	: Fosfolipaz A ₂
PLC	: Fosfolipaz C
PLD	: Fosfolipaz D
PLZF	: Promiyolositik Lösemik Çinko Parmak Protein
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florid
PS	: Fosfatidil Serin
P-S	: Penisilin Streptomisin
Pyk2	: Prolinden Zengin Tirozin Kinaz 2
RAC	: A ve C ile İlişkili Proteinler
RAS	: Renin-anjiyotensin Sistemi
RIP	: Ribozom İnhibe Eden Protein
SAPK	: Stres-uyarımli Protein Kinaz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
STAT	: Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü
STİ	: Soya Tripsin İnhibitör
TBS	: Tris Tuz Tamponu
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
TGF-β1	: Trofoblast Büyüme Faktörü- β1
TNFR1	: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 1
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör-α
TRADD	: Ölüm Birimi Üzerinden TNFRSF1A-ilişkili Olan
UV	: Ultra Viyole
VDKH	: Vasküler Düz Kas Hücresi
WR	: Çalışma Solüsyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL		SAYFA
Şekil 2.1	Tipik bir arter ve vasküler yapının fizyolojisi	4
Şekil 2.2	Klasik Renin-Anjiyotensin Sistem şeması	5
Şekil 2.3	VDKH'lerinde Ang II bağımlı sinyal yolları	7
Şekil 2.4	VDKH'lerinde Ang II tarafından uyarılan tirozin kinaz yolları	8
Şekil 2.5	Ana apoptotik yolların şematik gösterimi	11
Şekil 2.6	DNA fragmentasyon fazı ve yapısal değişimlerin şematik gösterimi	12
Şekil 2.7	Hücre içerisinde Ras'ın aktivasyonu	15
Şekil 3.1	Protein standart grafiği	28
Şekil 4.1	VDKH kültürlerinin immünohistokimyasal karakterizasyonu	43
Şekil 4.2	VDKH'lerinde And II'nin farklı konsantrasyonlarının Akt/PKB üzerine etkisi	44
Şekil 4.3	VDKH kültürlerinde Ang II'nin Akt/PKB üzerine farklı sürelerde etkisi	45
Şekil 4.4	VDKH'lerinde Ang II konsantrasyonunun Bad aktivasyonu üzerine etkisi	46
Şekil 4.5	VDKH kültürlerinde Ang II'nin Bad üzerine farklı sürelerde etkisi	47
Şekil 4.6	VDKH'lerinde Ang II konsantrasyonunun Ras miktarı üzerine etkisi	48
Şekil 4.7	VDKH kültürlerinde Ang II'nin Ras miktarı üzerine farklı sürelerde etkileri	49

Şekil 4.8	VDKH'lerinde Ang II konsantrasyonunun Bad/Bcl-X _L kompleks oluşumu üzerine etkisi	50
Şekil 4.9	VDKH kültüründe Ang II'nin Bad/Bcl-X _L kompleks oluşumu üzerine farklı sürelerde etkisi	51
Şekil 4.10	VDKH'lerinde AT1 reseptörünün Akt/PKB üzerindeki rolü	52
Şekil 4.11	VDKH'lerinde Akt/PKB uyarımı PI3-K üzerinden gerçekleşmektedir	53
Şekil 4.12	Ang II ile uyarılan VDKH'lerinde GF109203X, PP2, FPT III, AG1478 ve AG1295 uygulamalarının Akt/PKB ve Bad fosforilasyonları, Ras miktarı ve Bad/Bcl-X _L kompleks oluşumu üzerine etkileri	55-57
Şekil 4.13	VDKH'lerinde Wortmanin, AG490 ve SH-5 varlığında IFN- γ ve/veya Fas-L Apoptozisi indüklemektedir	59
Şekil 4.14	VDKH'lerinde apoptozisin Anneksin V-FITC ile ifadesi	60
Şekil 4.15	VDKH'lerinde Ang II apoptotik etkilerini AT1R üzerinden göstermektedir	62
Şekil 4.16	VDKH'lerinin pCH110 DNA'sı ile transfeksiyonu	63
Şekil 4.17	H-Ras ^{N17} transfeksiyonundan sonra artmış Ras miktarı	64
Şekil 4.18	Ras transfeksiyonu sonrasında azalmış Akt/PKB fosforilasyonu ve Bad/Bcl-X _L kompleks oluşumu	65
Şekil 4.19	Ras ^{N17} ile transfekte edilen VDKH'lerinde apoptozis uyarılamamıştır	66

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLO	SAYFA
Tablo 3.1 Enzim ayrışma solüsyonu bileşenleri ve miktarları	20
Tablo 3.2 Ayrışma jeli tamponları ve miktarları	30
Tablo 3.3 Yükleme jeli tamponları ve miktarları	31
Tablo 3.4 Kaspas-3 deneyinde kullanılan çözeltilerin miktarları	38
Tablo 3.5 Kullanılan DNA:FuGENE oranları	40
Tablo 3.6 Boyama solüsyonu karışımı ve miktarları	41

GİRİŞ

Apoptozis, düzgün organ yapısını ve fizyolojisini oluşturmak ve korumak için birçok organ ve dokudaki hücrelerin programlanmış ölümünden sorumlu fizyolojik bir işlemdir. Damar sisteminde bulunan düz kas dokusundaki apoptozis, vasküler hasar ve aterosiklerotik lezyonlardaki gelişime olduğu kadar, fetalden neonatal bir dolaşıma geçişin sonucunda kan akışındaki uzun süreli azalmaya bağlı olarak gösterilmiştir.

Vasküler düz kas hücre (VDKH) proliferasyonunun mekanizmasına yönelik birçok çalışmanın ardından, son yapılan araştırmalar, normal damar gelişimi ve patolojisinde düz kas hücrelerini apoptozise ve/veya yaşamsallığa götüren sinyal yollarının mekanizmalarını anlama doğrultusunda gerçekleştirilmektedir. VDKH büyümesi, hücre proliferasyonu ve apoptozisin karşılıklı etkilerinin bir sonucu olarak görülmektedir.

VDKH'leri için bilinen birçok büyüme faktörü [İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), platelet türevli büyüme faktörü-BB (PDGF-BB), fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2), trofoblast büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1)] mitojenden çok birer yaşamsal faktör gibi davrandıkları gösterilmiştir. Bu büyüme faktörlerinden zengin ancak düşük serum düzeyine sahip besi yerlerinde kültüre edilmiş rat veya insan VDKH'lerini Bcl-2 ailesi proteinlerinin anti-apoptotik potansiyellerini kullanarak, kısmen apoptozisten korurlar [1, 2]. Büyüme faktörleri ve bunların ilişkili reseptörleri birçok vasküler hastalıkta eksprese olurlar ve arteriyal duvar içerisinde VDKH ölümünü engelleyebilirler.

Aterosikleroziste oluşan hücre ölümleri üzerine yapılan gözlemler ilk olarak 1858 yılında Virchow [3] tarafından gerçekleştirilmiş ve 30 sene kadar önce 1976 yılında Thomas ve arkadaşları [4] tarafından kolesterolce-zengin besinle beslenen domuzlar üzerinde yapılan deneyler, aterosiklerotik plak oluşumu sırasında hücre ölümünün majör olay olduğunu ve belki de hücre proliferasyonu ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Daha yakın zamanlarda, Parkes ve arkadaşları [5] düz kas hücrelerindeki plak-oluşumunu *c-myc*'nin hücre içi fazla birikmesi ile karakterize ve normal VDKH damarları ile kıyaslandığında kültür içerisinde, özellikle düşük serum düzeylerinde, bir büyüme dezavantajına sahip olduklarını göstermişlerdir [5]. O zamanlarda, kanser araştırmacıları, serum yokluğunda apoptozis tarafından indüklenen hücre ölümünün *c-myc*'nin hücre içerisinde fazla birikmesine bağlı olabileceğini ve bu hücrelerin *c-myc*'nin normal seviyelere çekilerek kurtarılacaklarını göstermişlerdir [6]. Bu sonuçlar temel alınarak, insan aterosiklerotik hücrelerin nekrozu yerine apoptozis tarafından hücre ölümünün gözlenebileceği önerilmektedir. Bennett ve arkadaşları, VDKH'lerinde *c-myc*'nin ekspresyonunun apoptozisi indükleyebileceğini [7] ve insan düz kas hücre

plaklarının *in-vitro* şartlarda, *bcl-2'nin* ekspresyonu ile veya IGF-1, PDGF veya anjiyotensin II (Ang II) gibi diğer yaşamsal faktörler ile geri dönüşümü olabilecek bir işlemde, apoptozisin oluşabileceği göstermişlerdir [8]. Bu insan aterosklerozisinde programlanmış hücre ölümünün (apoptozis) oluşabileceğine dair ilk bulgudur.

İnsan doku plakları içerisindeki düz kas hücreleri IGF-1, PDGF ve Ang II gibi yaşamsal faktörlerin varlığına rağmen ölmektedir [8]. Belirgin Bcl-2 ekspresyonunun yokluğunda c-myc'nin ekspresyonu [9] ve p53'e olan artmış duyarlılık [9] bazı açıklamalar getirebilir. Son yapılan çalışmalarda, ileri düz kas aterosklerotik plaklardaki, pro-apoptotik Bax proteininin artmış ekspresyonu gösterilmiştir. Bax, yüksek miktarda anti-apoptotik Bcl-X_L proteininin ekspresyonunda bile normal damarlarda gözlenmemiştir [10]. Bundan dolayı, ateroskleroziste pro- ve anti-apoptotik proteinler arasındaki denge, ek bir pro-apoptotik uyarım (imflamatuvar hücreler ve sitokinler) mevcut iken düz kas hücre plakları ölüme programlanmış ve apoptozise giderler düşüncesi ile belirsizlik kazanabilir [10].

Ang II renin-angiotensin sisteminin başlıca peptid hormonudur ve kan dolaşım ve basıncının ayarlanmasında anahtar bir rol oynar. Buna ek olarak, hipertansiyon ve aterosklerozis gibi VDKH'nin yığılması ile karakterize olan birçok kardiyovasküler hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir [11]. Son bulgular, damar yapısı ve lezyon oluşumunun belirlenmesinde sadece hücre büyümesinin regülasyonunun değil apoptozis ile hücre ölümünün de önemli olabileceğini göstermiştir [12]. Buna karşın, Ang II'nin anti-apoptotik etkileri ve büyümeyi desteklemekten sorumlu moleküler mekanizmaları halen tam olarak anlaşılmış değildir.

A ve C ile ilişkili (RAC; Related A and C proteins)-protein kinaz olarak da bilinen Akt/protein kinaz B (Akt/PKB), NH₂-terminal son bölgesinde bir plekstrin-homoloji birimi içeren bir serin/treonin kinazdır ve hem siklik adenosin monofosfat (cAMP)-bağımlı protein kinaz ve hem de protein kinaz C (PKC) benzer yakınlıkta bir katalitik birim içerir. Ayrıca retroviral onkogen v-Akt ürününün hücresel homologudur [13]. Akt/PKB'nin kinaz aktivitesi PDGF, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve insülin reseptörleri gibi tirozin kinazlar tarafından uyarıldığı ve bu büyüme faktörlerince Akt/PKB'nin aktivasyonu fosfatidil inozitol 3-kinaz (PI3-K) aracılı olduğu bulunmuştur [14]. Son bulgular PI3-K'ın, Akt/PKB sinyalizasyon yolu üzerinden apoptozisten korunmayı da içeren bazı hücresel cevaplarının da olduğunu göstermektedir [15]. Buna karşın, özellikle yedi-transmembran G protein-bağımlı reseptörlerine bağımlı sinyal yollarına Akt/PKB'nin katılımı ile ilgili çok az şey bilinmektedir.

Ras proteininin aktivasyonunun, memeli hücrelerinin birçok tipinden türeyen immortal hücre dizilerinde transformasyonu ve hücre proliferasyonunu tetiklediği ve insanlarda tümöröenezis ile alakalı olduğu gösterilmiştir [16]. İnsan primer fibroblast hücrelerinde yapılan son çalışmalar, Ras sinyalizasyon yolu aktivasyonunun hücresel yaşamsallığı tetiklediği rapor edilmiştir [17-19]. Yaşlanan vasküler endotelial

hücreler, normal lezyonlarda değil fakat ağırlıklı olarak insan aterosklerozisinin plağında lokalizedir ve vasküler hücre yaşlanması endotelial bozuklukla sonuçlanır [20]. Büyüme faktörleri ve oksidatif stresi de içeren birçok aterojenik uyarım Ras aktivitesince oluşturulur [21]. Ras'ın aktivasyonunun vasküler hücre yaşamsallığına katkı yaptığı, bundan dolayı da insan aterosklerozisinin patogenezi doğurduğu düşünülmektedir.

Literatürde gözlemlediğimiz sonuçlar ışığında, genel olarak apoptotik veya yaşamsal devamlılığı arz eden, Ang II üzerinden uyarılan hücre içi sinyalizasyon yolları, VDKH'de de diğer hücre tiplerindekine benzer yolları tercih etmektedir. Bu noktada izlenen yol kabaca, Ang II uyarımından sonra Ras aktivasyonunu [22] takiben PI3-K uyarımına bağlı [23] bir C-terminal regülatuar birim ve bir N-terminal plekstrin-homoloji birimi içeren bir serin/treonin kinaz olan Akt/PKB'nin uyarımıdır [23]. Hücre, bu noktada (Akt kavşağında) gelen uyarıma bağlı olarak kendisini ya yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirecek bir siklüsün içinde, ya da apoptozis ile sonlanacak bir sinyal iletim yoluna sokacaktır.

Bu düşünceden yola çıkarak çalışmamızda, Ras plazmidi ile transfekte edilmiş ve normal VDKH'lerinde apoptotik şartlar altında Akt/PKB molekülünün rolü incelenmiştir. Bu doğrultuda, primer VDKH'leri öncelikle normal şartlar altında Ang II uyarımına bağlı olarak Akt/PKB fosforilasyonuna ve bunu takiben apoptozis ile ilgili Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumuna bakılmıştır.

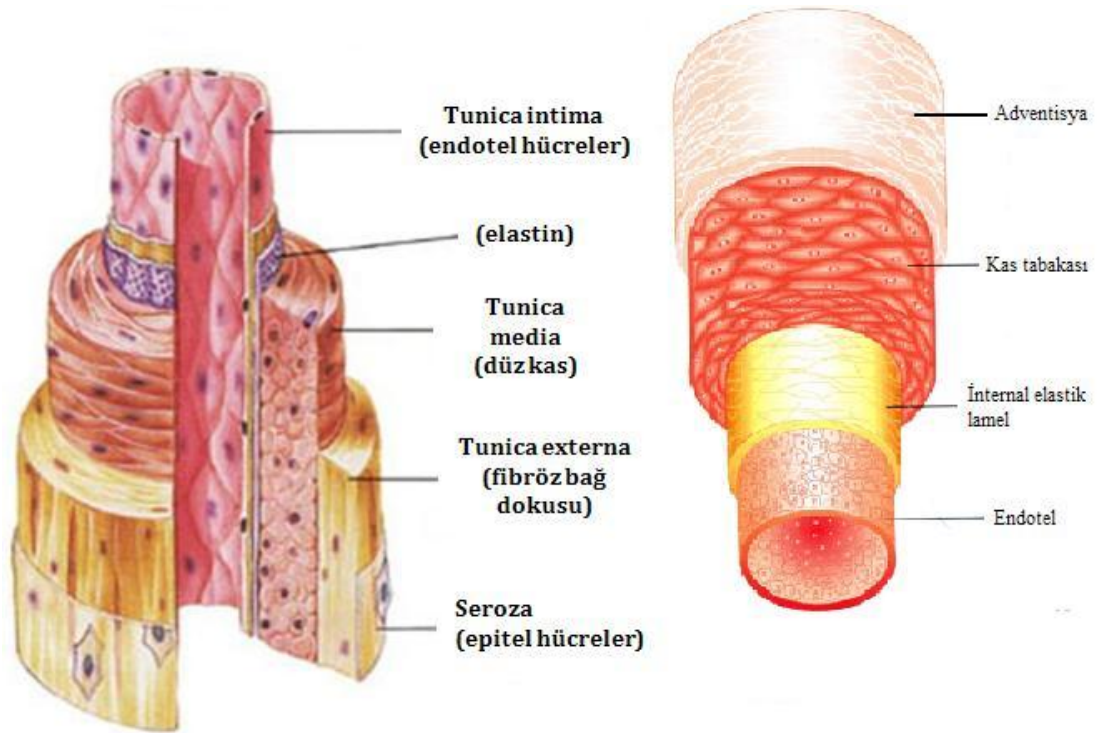
Bu doğrultuda, ilk olarak primer vasküler hücre kültüründe Ang II uyarımından sonra Akt/PKB uyarımına yol açan PI3-K fosforilasyonuna ve bunu takiben apoptotik belirteç olan Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumuna normal şartlar altında bakılmıştır. Bu yolakta Ang II, Ras ve PI3-K'nın spesifik inhibitörleri (sırasıyla losartan, PP1 ve wortmanin) kullanmak suretiyle kompleks oluşumuna olan etkileri incelenmiştir. Ardından normal hücre kültürü şartlarında interferon- γ (IFN- γ) uyarımı ile VDKH'leri apoptozise yönlendirilmiş ve aynı proteinlerin etkilerine bakılmıştır.

Bu aşamaların ardından, VDKH'leri Ras-plazmidi ile transfekte edilmişlerdir. Hücreler bu safhadan sonra, Ang II uyarımını takiben Akt/PKB ve bu molekülü izleyen yolak üzerindeki Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu Western blot tekniği ile gösterilmiştir. Son aşamada, transfekte edilmiş VDKH'leri yine IFN- γ ile apoptozise götürülmeye çalışılmış ve ardından apoptotik şartların gösterimi gerçekleştirildikten sonra, aynı koşullarda Akt/PKB ve yine yolak üzerindeki Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumuna bakılarak elde edilen bulgular yorumlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Vasküler Yapı

Vasküler duvar, hücresel (endotelial hücreler, vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlar) ve hücresel olmayan (ekstrasellüler matriks) bileşenlerden meydana gelmiş aktif, esnek ve bütünleşmiş bir organdır (Şekil 2.1). Statik bir organ değildir; birimler dinamik olarak şekil değiştirirler, fizyolojik ve patolojik uyarılara cevaben artar, azalır veya yeniden organize olurlar [24].



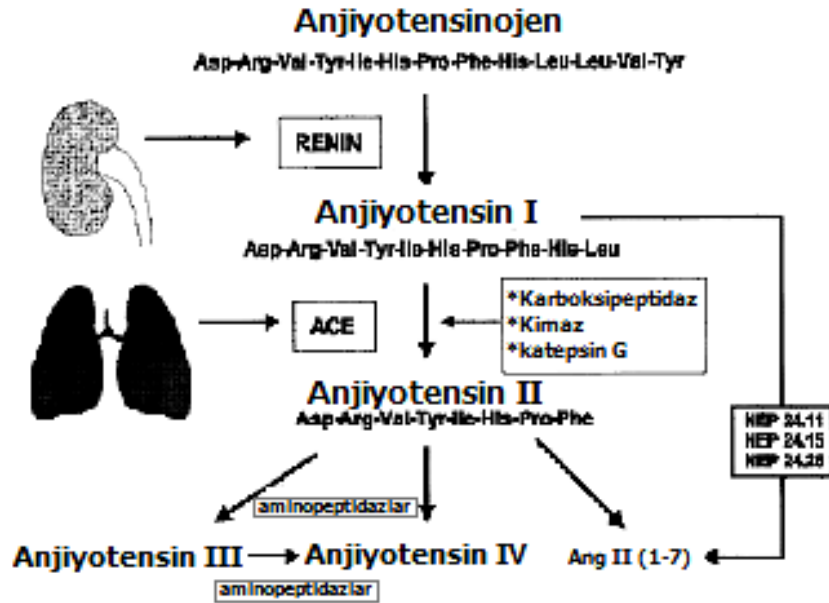
Şekil 2.1. Tipik bir arter ve vasküler yapının fizyolojisi [25]

Tüm bir arteriyal ortam içerisinde, düz kas hücreleri ve matriks, hipertansiyon ve ateroskleroz da olduğu gibi kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde onarım, tekrardan yapılaşma, gelişim, büyüme ve kasılma-gevşemeyi de içeren, vasküler duvarın karakteristik fonksiyon ve yapılarından sorumludur [26-29]. Siklik nükleotidlerin düzeylerini arttırmak suretiyle vazodilatasyonu indükleyen C-tipi natriüretik peptid, prostasiklin ve nitrik oksit gibi vazorelaksasyon faktörleri ve büyüme ve vazokonstrüksiyonu uyarıcı Endotelin-1 (ET-1) ve Ang II gibi vazooaktif peptidleri de içeren birçok lokal ve sistemik faktörler vasküler düz kas hücre fonksiyonlarını regüle ederler [30-32].

2.2. Anjiotensin II

Ang II, vasküler düz kasları üzerinde birçok etkiye sahip multifonksiyonel bir peptiddir; kasılmayı, hücre büyümesini ve apoptozisi regüle eder, hücre göçünü ve ekstrasellüler matriks yerleşimini etkiler, bir proenflamatuardır ve PDGF ve vazokonstrüktörler (ET-1) gibi diğer büyüme faktörlerinin üretimini uyarır [33].

Bir oktapeptid hormon olan Ang II, renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) aktif bir bileşenidir. Ang II, klasik veya renal RAS ve lokal olarak doku RAS üzerinden sistematik bir şekilde üretilir. Ang II, anjiyotensinojenin Anjiyotensin I'e (Ang I) aspartil proteaz renin tarafından enzimatik olarak kırılmasını takiben anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) etkisiyle Ang I'in Ang II'ye çevrimi ile meydana gelir (Şekil 2.2). Son olarak belirlenen bir karboksipeptidaz, ACE2, Ang I veya Ang II'nin herhangi birisinden bir amino asit kopartarak [34] vazodilatatör özellikleri olan Ang 1-7 metabolitlerini arttırırken Ang II seviyesini düşürür. Bu da Ang II düzeyinin kontrolünde ACE ve ACE2 arasındaki dengenin önemli olduğunu göstermektedir [35]. Bununla birlikte, Ang II oluşumunda ACE'nin primer enzim olduğu gözlenmekte ise de, kalp de Ang I'in büyük bir çoğunluğu kimaz enzimi tarafından dönüştürülür [36].



Şekil 2.2. Klasik Renin-Anjiyotensin Sistem Şeması. Dolaşımdaki renal kökenli renin, hepatik kökenli anjiyotensinojeni parçalar ve decapeptit Ang I'i oluşturur. Akciğerdeki ve dokulardaki ACE Ang I'i Ang II'ye dönüştürür. Ang II, Anjiyotensin III (Ang III) ve Anjiyotensin IV (Ang IV) ve Ang II'ye metabolize edilir. Kimaz, karboksipeptidaz ve katapsin G gibi bazı bileşikler Ang I ve Ang II'yi parçalayabilir [37].

2.3. Anjiotensin II Reseptörleri

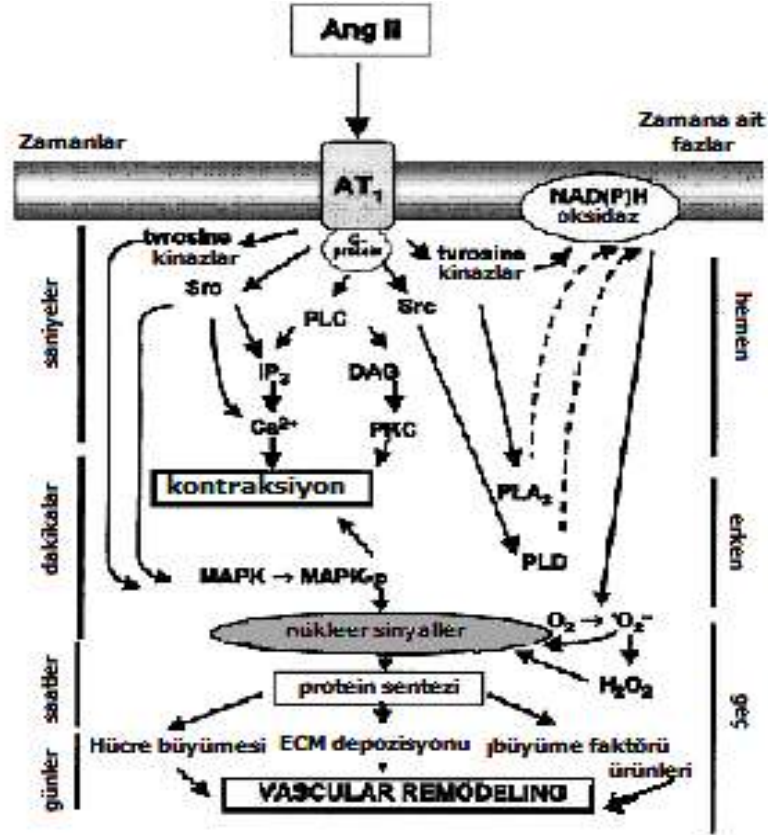
2.3.1. Anjiotensin Tip I Reseptörleri (AT1)

Ang II'nin bilinen birçok fizyolojik etkisi, karaciğer, adrenaller, beyin, akciğerler, böbrekler, kalp ve vasküler yapıyı da kapsayan geniş bir biçimde çoğu organda hücre yüzeyinde bulunan anjiyotensin tip I reseptörleri (AT1R) tarafından oluşturulur. Yaklaşık 40 kDa ağırlığındaki 359 amino asitten meydana gelmiş AT1R'ü, G-eşleşmiş protein reseptörlerinin yedi-membran süper ailesine mensuptur [11]. Mevcut AT1R alt birimlerinin, AT1AR ve AT1BR, birbirlerinden fonksiyonel ve farmakolojik olarak ayırt edilmesi mümkün değildir [38]; buna karşın, *in-vivo* deneyler, kan basıncının ayarlanmasında AT1AR izoformunun AT1BR izoformuna oranla daha önemli olduğunu göstermiştir [39]. G protein etkileşimleri, transmembran biriminin NH2 terminali, birinci ve üçüncü ekstrasellüler döngüleri üzerinde gerçekleşir [40]. Reseptörün ekstrasellüler bölgesi üzerinde konuşlanmış birçok birim ile beraber, AT1R'nün dört sistein birimi disülfid köprülerini oluşturur ve bu Ang II bağlanması için gereklidir [41]. Diğer reseptörlere (muskarinik ve adrenerjik) benzer olarak AT1 reseptörünün sitoplazmik kuyruğu, G protein reseptör kinazları tarafından fosforillenen birçok serin/treonin birimi içerir.

2.3.2. Anjiotensin Tip II Reseptörleri (AT2)

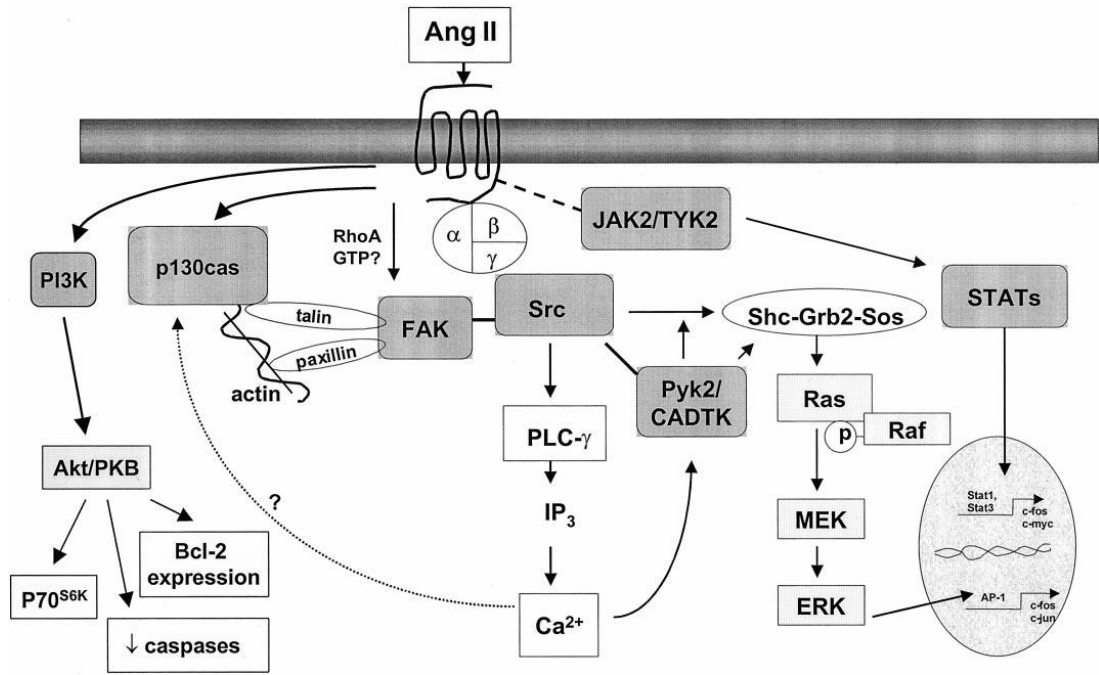
Ang II'nin birçok vazoaaktif etkisi AT1R'leri üzerinden gerçekleşse de, AT1R'lerinin antagonize edilmesi ile VDKH pro-apoptotik ve anti-proliferatif değişimlerin AT2R'leri üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir [11]. AT1R'lerine benzer olarak AT2R'ü de (41 kDa) bir yedi transmembran birim reseptörüdür, fakat sadece %34'ü AT1R'üne benzerlik gösterir [42]. Tamamı 363 amino asitten meydana gelmiş olan AT2R'ü yüksek oranda fetal dokuda gözlenmesine karşın, fetal aorta, gastrointestinal mezenşimal hücreler, bağ doku, iskelet sistemi, beyin ve adrenal medullada da mevcuttur. AT2R'nün doğumdan sonra ekspresyonunun azalması, patolojik durumlara bağlı olarak erişkin yaşamda sonradan indüklenebileceğini ve fetal oluşumda daha önemli bir rolünün olduğunu vurgulamaktadır [43]. AT2R'leri, ayrıca, düşük oranda böbrekte, akciğer ve karaciğerde saptanmış, fakat Ang II'nin fonksiyonlarındaki kesin rolleri belirsizliğini korumaktadır. Çalışmalar, AT2R'nün AT1R'ünün etkilerini, tirozin veya serin/treonin fosfatazlarının aktivasyonu üzerinden sinyal yollarını inhibe ettiğini göstermiştir [44, 45]. Buna karşın, D'Amore ve arkadaşları [46], AT1R-uyarımli hipertrofiyi bloke etmeden ve Ang II'den bağımsız olarak, kardiyomiyositlerde, AT2R'nün hipertrofiye sebebiyet verdiğini göstermişlerdir. Bu hipertrofik cevap, transkripsiyon faktör PLZF'nin (promiyelositik lösemik çinko parmak protein) AT2R'nün kuyruğuna direkt bağlanması sonucu, PI3-K'ın alt birimi p85'in gelişmiş transkripsiyonu ve nükleer translokasyonu sonucudur [47, 48]. Bir başka bulgu da, bu iki reseptör tipinin dimerizasyonunun AT1R sinyalizasyonunda bir duraklamaya yol açtığıdır [49]. Yapılan birçok çalışmadaki çelişkili sonuçlar dolayısıyla, patolojik olarak (veya patolojik bir sonuç olarak) AT2R'nün oynadığı kesin rol belirsizliğini korumaktadır.

2.4. VDKH'lerinde Ang II Bağımlı Sinyal Yolları



Şekil 2.3. VDKH'lerinde Ang II Bağımlı Sinyal Yolları. Ang II AT1 reseptörüne bağlandığında ani sinyal olayları olarak saniyeler içerisinde fosfolipaz C (PLC) ve Src aktive olur. Fosfolipaz A₂ (PLA₂), fosfolipaz D (PLD), tirozin kinazlar ve mitojen aktiveli protein (MAP) kinazlar dakikalar içinde uyarılır ve bu olaylar erken sinyal iletim olayıdır. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu, proto-onkogen ekspresyonu, protein sentezi saatler içerisinde meydana gelir ve geç sinyal iletimi olarak adlandırılır [37].

Ang II, kasılma gibi kısa dönemli ve enflamasyon, ekstrasellüler matriks yerleşimi, göç ve hücre büyümesi gibi uzun vadeli vasküler etkilere yol açan intrasellüler sinyal iletimlerinin kaskatlarını regüle eder. Dış hücre membran yüzeyinde ligand reseptör bağlanması, G proteinleri (α , β ve γ alt birimlerinden meydana gelmiş heterotrimerik proteinler) üzerinden iç hücre membran yüzeyinde reseptör ve efektör protein arasındaki etkileşimi uyarır. AT1 reseptörleri, birçok biyolojik aktiviteye sebep veren belirli sinyal iletim proseslerini eşleştirir. Sinyal prosesleri belirli karaktere sahip ve multifaziktir (Şekil 2.3). Ani, erken ve geç sinyalizasyon olayları, sırasıyla, saniyede, dakikalar ve saatler içerisinde gerçekleşir (Şekil 2.3). Ang II-uyarımli PLC fosforilasyonu ve Src aktivasyonu saniyeler içerisinde gerçekleşir ve ani sinyalizasyonlar olarak nitelendirilir; PLA₂, PLD, tirozin kinazlar ve mitojen-uyarımli protein kinazların (MAPK) aktivasyonu dakikalar içerisinde olur ve erken sinyalizasyon prosesleridir; bunun yanında oksidatif stres, proto-onkogen ekspresyonu ve protein sentezinin oluşumu saatler alır ve geç sinyalizasyon olaylarını oluşturur.



Şekil 2.4. Vasküler düz kas hücrelerinde Ang II tarafından uyarılan tirozin kinaz yolları. Ang II hızlı bir şekilde PLC- γ ve ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK)-bağımlı sinyal yollarını regüle eden Src'i aktive eder. Ang II'nin AT1 reseptörüne bağlanması, sıralı çizgiler ile belirtilmiş Jak2/TYK2'nin (Janus kinazlar) aktivasyonu ve fiziksel etkileşimini uyarır. Jak2/TYK2, çekirdekte gen transkripsiyonunu aktive eden sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) proteinlerini fosforilleyerek translokasyonunu sağlarlar. Ang II, ayrıca, Src tarafından fosforillenen bölgelere yardımcı olan fokal adezyon kinazları (FAK) aktive eder. FAK, Aktin ile ilişkilenen paxillin ve talin ile etkileşime girer. AT1 reseptörü ile FAK arasındaki bağlantı belirsizdir, fakat guanozin trifosfatazlardan (GTPaz) Rho ailesi olayda potansiyel adaylardır. Prolinden zengin tirozin kinaz-2 (Pyk2) ve CADTK Ang II tarafından kalsiyum (Ca^{2+})-bağımlı yollar ile aktive edilirler. Aktive olmuş Pyk2 Src ve ERK-bağımlı sinyal kaskatlarını regüle eder. P130^{Cas} geçici olarak Ang II tarafından, büyük olasılıkla, Ca^{2+} -bağımlı yollar ile aktive olur. Fosforile p130^{Cas} , α -aktin ekspresyonunun regülasyonunda önemli bir rol oynayabilir. Ang II tarafından PI3-K'in aktivasyonu, p70^{S6K} 'in aktivasyonu ve hücre yaşamsallığına giden yolların uyarımında yer alan Akt/PKB aktivasyonuna yol açar [50].

Ang II, birçok vasküler düz kas hücre proteinini tirozin biriminden fosforiller. Bu durum, AT1 reseptörünün kendisi için de geçerli olduğu gibi, PLC- γ 1 ve Src ailesi kinazlarını (saniyeler içinde aktivasyon), bununla birlikte dakikalar içerisinde aktive olan JAK, TYK, FAK, Pyk2 ve p130^{Cas} (bir Crk-ilişkili substrat) ve PI3-K da kapsar [37] (Şekil 2.4). Kardiyovasküler hücrelerdeki Ang II-uyarımli sinyal iletim yollarındaki tirozin kinazların rolü 1997 yılında ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir [51-54].

2.4.1. Vasküler düz kas hücrelerinde Ang II tarafından uyarılan tirozin kinaz yolları; PI3-K ve Akt/protein kinaz B (PKB)

Bunlardan PI3-K, bir p85 adaptör ve bir p110 katalitik alt birimden oluşmuş heterodimerik bir enzimdir. PI3-K, 3. atomundan fosforillenen fosfoinozitidlerin sentezini katalizler. PI3-K'nın majör ürünleri hücre yaşamsallığını, metabolizmayı, iskeletsel yapısallaşmayı ve membran trafiğini indükler ve VDKH çoğalmasının regülasyonunda önemli bir rol oynadığı da gösterilmiştir [55]. PI3-K, karakteristik olarak tirozin kinaz reseptörleri ile ilişkilidir ve AT1 reseptörleri tarafından da aktive edilir [56, 57]. VDKH'lerinde Ang II, PI3-K'nın aktivitesini, fosforilasyonunu ve göçünü stimüle eder ve p85 alt biriminin perinükleer alandan aktive olduğu bölgeye sitoplazma boyunca translokasyonunu uyarır [56]. Wortmanin ve LY294002 tarafından inhibe edilen PI3-K rat hücre kültürlerinde Ang II-uyarımli hiperplaziyi bloke etmiştir, bu da VDKH çoğalmasındaki non-reseptör tirozin kinazların regülasyonunda önemli bir rolü olduğunu önermektedir [56]. Aktin-bağlayan-protein profilin, fosfoinozitid-bağımlı kinazlar, atipik PKC'ler, PLC- γ , Rac1, c-Jun N-terminal protein kinaz (JNK) ve Ser/Thr kinaz Akt/ PKB de kapsayan pek çok molekül PI3-K için hedef olarak bulunmuştur [57]. Akt/PKB, Ang II-uyarımli VDKH'lerinde PI3-K aşağı yolağında önemli bir hedef olarak gösterilmektedir. Akt, p70S6-kinazı aktive ederek protein sentezini regüle eder ve Ca^{2+} kanallarını indükleyerek aortik hücrelerde Ang II-uyarımli Ca^{2+} cevaplarını modüle eder. Akt/PKB, ayrıca, VDKH'lerini apoptozisten koruduğu ve kaspasları inhibe ederek c-Myc ve Bcl-2 uyarımları ile hücre yaşamsallığını düzenlediği gösterilmiştir [57]. PI3-K-bağımlı Akt'nin AT1 reseptör uyarımli aktivasyonundaki mekanizma halen belirsizdir, fakat redoks-duyarlı yollar ve c-Src önemli olabilir. VDKH'leri Ang II sinyalizasyonunda PI3-K'nın kesin rolü belirlenememiş olsa da, bu kompleks yol mitojenezis ve apoptozis arasındaki dengenin kontrolünde rol oynadığı düşünülmektedir.

2.5. Apoptozis

Vasküler patolojistler tarafından, nekrozun olmadığı durumlarda, normal yaşlanma esnasında [58] veya ateroskleroziste arteriyal duvar içerisindeki hücre ölümünün [3, 4] gözlenmesi, uzun zamandır merak uyandırmıştır. Nekrozis dışında hücre ölümünün belirgin yeni bir tanımının, 1970'lerin başında Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanmasının ardından ki, buna "apoptozis" dediler (Yunancada, "düşme" anlamına gelen kelimedir) [59], bu gözlemler için elle tutulur mantıklı açıklamalara ulaşılmış oldu. Bundan sonra artan bir şekilde, normal gelişim esnasında birçok kritik olayın oluşmasında ve belki de birçok hastalıkta apoptozisin bir anahtar rol oynadığı tespit edilmiştir [60].

Uyarılmış hücre ölümü veya "onkosis" in klasik formu ile ilişkili, membran parçalanması, kabarması ve organel ve hücrelerin şişmesinden farklı olarak, apoptozis, ilk olarak karakteristik morfolojilerinin temeline dayanarak, hücrelerin ölüme programlanması olarak tarif edilmiştir [59]. Apoptozise giden hücrelerde, hücre çökmesi, kromatin marjinasyonu ve yoğunlaşmayı takiben DNA'nın internükleosomal fragmentasyonu, fosfolipidlerin membranda yeniden dağılımı [61] ve genişleme ile beraber membran bütünlüğünün bozulumu, görülür. İşlem, makrofajlar veya bitişik komşu hücreler tarafından tanınıp bir enflamatuvar cevabın tetiklenmesine izin vermeden hızlı bir şekilde tanınıp yok edilen apoptotik parçalara

ayrılması ile sonuçlanır. Buna karşın, fagositozdan kaçan ve serbest kalan hücreler bir ikinci nekroza giderler [62].

Apoptozis, normal gelişim esnasında, intrinsek sinyaller tarafından tetiklenebilir. Böyle bir durum, bağlantının kaybolması veya hemodinamik parametrelerdeki değişimler, yaşamsal faktörlerin geri çekilimi, bir iç saate cevaben, hücrenin kendini-yok etmesine (hücre intiharı, programlı hücre ölümü) dayanan bir iç programı aktive etmesiyle oluşur [63]. Her hücre, aktif bir sinyal ile aksi söylenmediği takdirde, kendini-yok edecek yolağa bağlanmaya hazır ve intihar mekanizmasının tüm birimlerini barındırır.

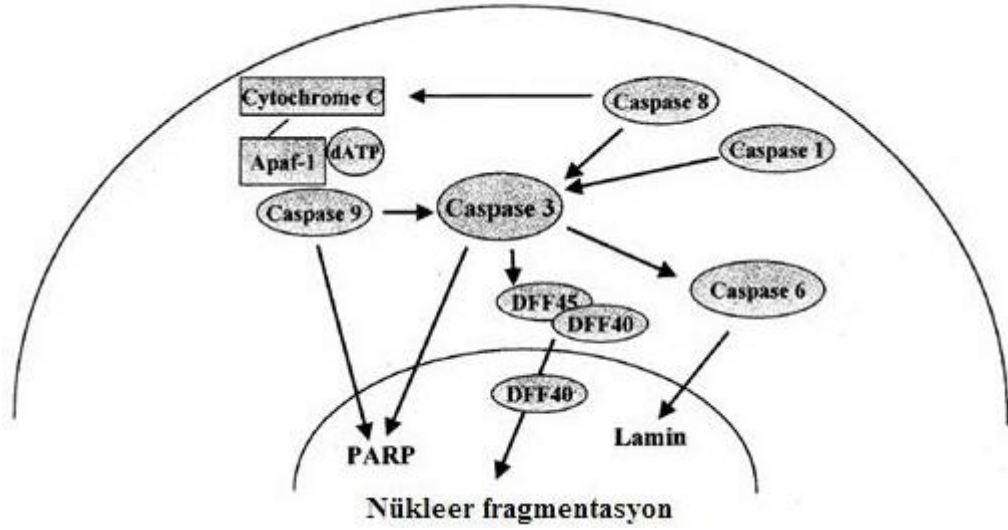
Diğer taraftan, apoptozis, iyonize edici veya viral ajanlar, kemoterapötikler, okside lipidler, hormonlar ve sitokinler gibi ekstresek sinyallerin birçoğu tarafından da tetiklenebilir [64]. Normal gelişim esnasında gözlenen, hücrelerin daha kronik ve aşamalı kaybına karşın, ekstresek sinyaller tarafından tetiklenen apoptozis genel olarak daha akut ve ağırdır. Bundan dolayı, apoptotik hücrelerin kaldırılması için gereken kapasite aşılmış olabilir ve yok edilememiş apoptotik hücrelerin ikincil nekrozu sık görülen bir olaydır [63]. Bu da oto-immün cevapların ve/veya enflamasyon uyarımları için potansiyel bir ortam ile beraber hücrel yıkıntının kronik birikimine sebebiyet verir [65-67].

Apoptozis, bir dizi sıralı stereo-tip kaskatlardan oluşan hücrel olaylar tarafından kontrol edilir [63]. Bazı ölüm-ilişkili sinyal yollarına (örneğin, radyasyon-uyarım DNA hasarına katılan) çok sık rastlanırken, bazıları sadece hücreye özeldir; bundan dolayı, apoptoza uğrayanlara bitişik diğer hücre tiplerinin eliminasyonu sağlanarak efektif bir yıkım gerçekleşir [63]. Belirlenen zamanda hücre içerisindeki pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin göreceli miktarı hücrenin kaderini belirleyecektir.

2.5.1. Programlanmış Hücre Ölüm Basamakları

Programlanmış hücre ölüm kaskadı en az belirli dört ana fonksiyonel basamağa bölünebilir [68-70] (Şekil 2.5).

- (1) Hücrelerin ölüm-uyarım sinyalini aldıkları sıradaki *sinyalizasyon fazı veya başlangıç*. Kaspas-8 aktivasyonu için gereken, ölüm birimi proteinlerinin [Ölüm birimi ile Fas-ilişkili protein (FADD), ölüm birimi üzerinden TNFRSF1A-ilişkili olan (TRADD), ribozom inhibe eden protein (RIP)] birbirini izleyen sıralanışları ile hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine [Tümör nekrozis faktör reseptörü 1 (TNFR1), Fas] ölüm-uyarıcı moleküllerin (Tümör Nekrozis faktör (TNF)- α , Fas ligand) bağlanmasıdır [71].
- (2) Mitokondriyal membran potansiyelinin kaybıyla gözlenen kaspasların *kontrol ve efektör faz* esnasındaki aktivasyonu [72]. Kaspaslar, memeli CED-3 homologları, apoptotik programın infaz ve transdüksiyonuna karışan aspartat spesifiteli sistein proteazlarının bir ailesidir [73]. Kaspasların çoğu proteolitik yarıklarından aktive olan inaktif pro-enzimler olarak hücrede bulunurlar. Bunlar bir hücrenin kasıtlı olarak



Şekil 2.6. DNA fragmentasyon fazı ve yapısal değişimlerin şematik gösterimi. DNA kırılma faktörü (DFF) iki alt birimden oluşur, DFF45 (ICAD) ve DFF40 (CAD). DFF45'in kaspas-3 tarafından yarılması, DFF40'ın nükleaz aktivitesini harekete geçirir. Kaspaslar için diğer substratlar PARP ve lamindir [63].

Plazma membran PS'nin yeniden çapraz dağılımını, apoptotik hücre ölümünün ortak bir özelliği olan membran partiküllerinin saçılımı takip eder [82]. Bir dış membran sıkışması gösteren ve PS için güçlü bir afiniteye sahip Anneksin V, kaspas-3'ün proteolitik aktivasyonunun şiddetini düşürebilir ve saçılmış membran mikro partiküllerinin salınımını tamamen bloke edebilir [83].

VDKH'leri için birçok pro-apoptotik faktör, aterosiklerozis, restenozis veya hipertansiyon gibi birçok vasküler hastalıkta saptanmıştır.

2.5.2. Hücreyi Apoptozise Götüren Başlıca Etmenler

➔ *Mekanik etkiler.* Balon anjiyoplastisi, normal arteriyel duvar içerisindeki VDKH'nin hızlı ölümünü tetikler [84]. VDKH apoptozisi, stres-uyarımlı protein kinazın (SAPK) aktivasyonuna sebebiyet veren bir redoks-duyarlı sinyalizasyon yolunun tetiklenmesi ile ilişkilidir. Neointimal düz kas hücrelerinde bu sinyalizasyon yolu, bu hücrelerdeki anti-apoptotik mediyatör Bcl-X_L'in yukarı-düzenlenmesine bağlı olarak, aktive olamaz [84].

➔ *Okside LDL.* Okside LDL [85] ve oksisteroller [86], kaspas-3'ün aktivasyonu ve Bcl-2'nin aşağı-düzenlenmesi tarafından kısmi olarak, kültür ortamında VDKH apoptozunu tetiklediği gösterilmiştir [86].

➔ *Vazoaktif maddeler.* Arteriyel duvar içerisinde nitrik oksidin (NO) yüksek miktarlarının lokal üretimi, hücre büyümesini ve neointimal oluşumu inhibe ederken [87], damar duvarındaki Ang II'nin zorlanmış lokal oluşumu (ACE over-ekspresyonundan sonra) VDKH büyümesini ve duvar kalınlaşmasını teşvik eder [88]. Vasküler yatağın yeniden şekillenmesi üzerine gerçekleşen bu etkiler, VDKH'lerinde ki apoptotik işlemin bir ayarlanması sonucudur. VDKH'lerinde ki

NO-uyarımli apoptozis, Ang II ilavesi ile (AT1 reseptörü üzerinden) engellenebilmesi, VDKH büyümesinin modülasyonunda Ang II ve NO arasındaki dengenin önemini göstermektedir [89]. VDKH apoptozu üzerine Ang II'nin, AT1 reseptör uyarımı üzerinden hücre ölümünü engelleyerek ve AT2 reseptör uyarımı ile de apoptozisi tetiklemek koşulu ile [90], çift yönlü bir etkisi vardır. Bu noktada, AT2 reseptörünün yoğunluklu olarak fetüste eksprese olduğu ve eser miktarda erişkin dokularda olduğu unutulmamalıdır. Bundan dolayı, gelişim esnasında vasküler yenilenmede majör bir rol oynayabilir fakat erişkinlerdeki rolü halen çözümlenmeyi beklemektedir.

→ *Enflamatuar mediyatörler.* İnsan VDKH'lerinde olmasa da rat VDKH'lerinde pro-enflamatuar sitokinlerin [TNF- α , INF- γ ve interlökin-1 (IL-1)] pro-apoptotik etkileri için, uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) tarafından oluşturulan NO'nun yüksek miktarlarda meydana gelişi, bir ortam sağlar [91]. Pro-enflamatuar sitokinler tarafından kültüre edilmiş VDKH'lerinin uyarılması, ayrıca, Fas'ın ekspresyonunu da (ve apoptozise karşı hassasiyetlerini de artırır) indükler [92] ki, bu da aterosklerozda immün hücreler tarafından bu tip sitokinlerin üretiminin bu yol üzerinden VDKH ölümünü tetiklediğini düşündürebilir. Enflamatuar hücreler, özellikle makrofajların, kültür ortamı içerisinde VDKH apoptozunu indüklemeye potansiyelleri vardır. Bu proses, hücre-hücre teması üzerine ve TNF α ve Fas-L'in kendilerine ait reseptörleri TNFR-I, II ve Fas ile etkileşimlerine bağımlıdır [93].

2.5.3. VDKH'lerinde Apoptozis

VDKH apoptozisi, *in-vitro* olarak, protein kinaz c inhibitörleri, kalsiyum kanal blokörleri, ACE inhibitörleri, cAMP-bağımlı protein kinaz stimilatörleri [94] ve metelloproteinaz tip 3 doku inhibitörleri [95] gibi birçok faktör tarafından, indüklenebilir. Buna karşın, bu faktörlerin pro-apoptotik etkilerinin klinik tatbikata uygunlukları halen tartışılmaktadır.

VDKH'leri ölüm reseptörü Fas'ı eksprese edebilirler, fakat Fas'ın kısmi olarak intrasellüler salınımına bağılı olarak göreceli bir biçimde Fas-uyarımli apoptozise dayanıklılık gösterir [96]. Plaklarda mevcut olan enflamatuar sitokinlerden IFN- γ , VDKH'lerini Fas-L-uyarımli ölüme götürebilir [96].

Fas, insan aterosklerotik plaklarında eksprese olur [92] ve apoptotik bölgelerde konuşlanması VDKH apoptozunun kısmi olarak Fas ligasyonu ile regüle olabileceğini göstermektedir. Birçok hücre tipine karşın, Fas/TNF-R1'ü VDKH'lerinde Golgi cihazı içerisinde konuşlanmıştır [97], bu da ek bir çaba olmaksızın hücreleri göreceli olarak Fas-uyarımli apoptozise dayanıklı kılar [98]. VDKH apoptozisi, sürekli olarak yüksek enflamatuar içerikli bölgelerde lokalize olmuştur [99] ki, bu da enflamatuar hücrelerin (makrofajlar ve T lenfositler) direkt olarak VDKH apoptozisini uyardığını ve/veya diğer bir uyarım tarafından apoptozis için VDKH'lerini hazırlayan sitokinleri oluşturduğunu göstermektedir [96]. Aslında, monositler/makrofajlar, direkt olarak VDKH apoptozunu Fas veya TNF-R1 [100-102] ve nitrik oksit ile [101] ve interlökin-1 β , TNF- α gibi sitokinler ile indükleyebildiği gibi, enflamatuar hücrelerden salınan IFN- γ [92] ile de

VDKH'lerini apoptozise duyarlı kılabilir. Fas'ın hücre yüzeyine gönderilmesi, VDKH ölümünü oluşumu için önemli bir mekanizma olabilir [96].

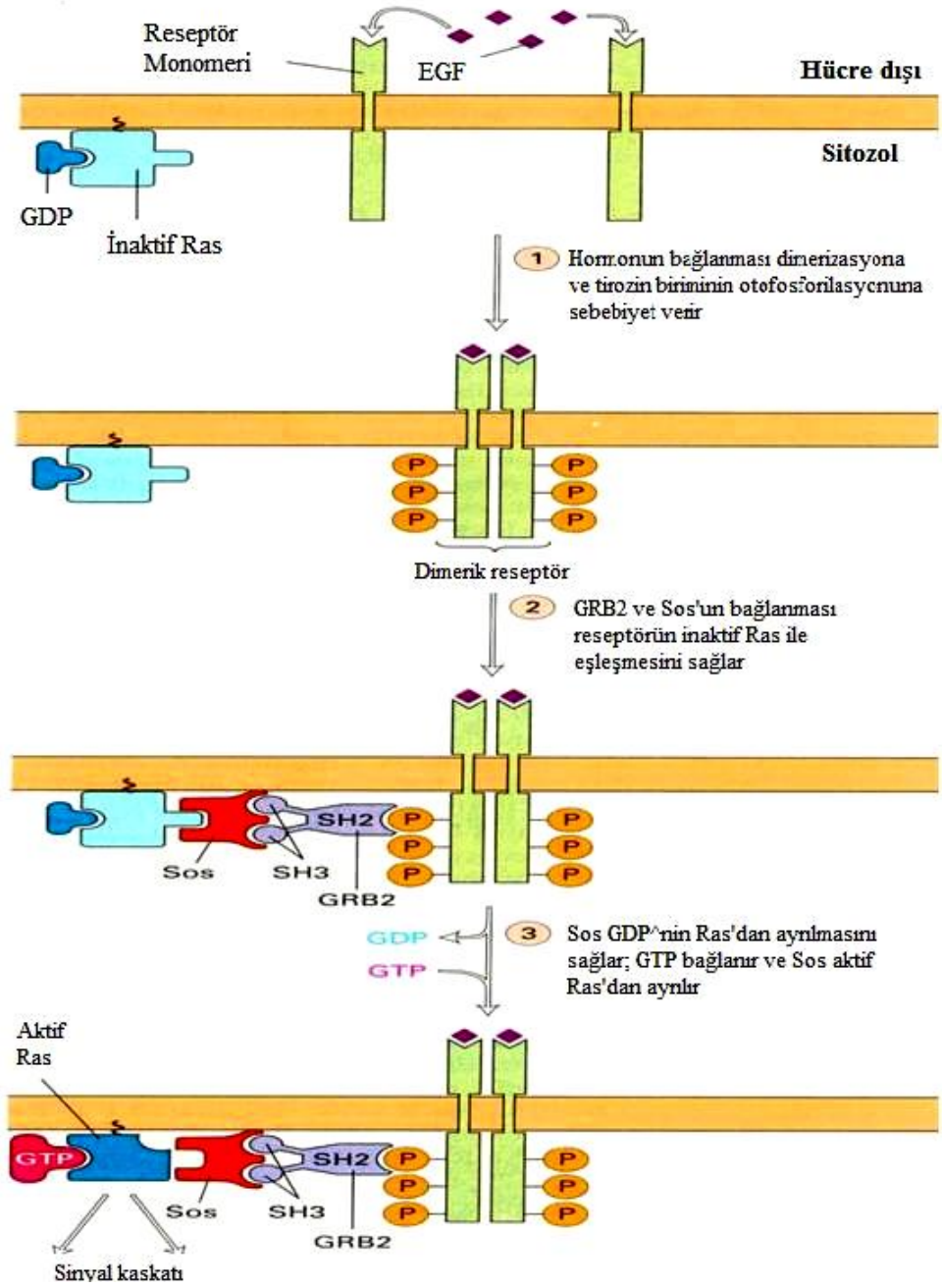
T-lenfosit-türevli sitokin IFN- γ , genel olarak intrasellüler Fas içeren bazı hücrelerin yüzeyine Fas'ı gönderdiği rapor edilmiştir [103]. Aterosklerotik plaklarda, *in-vivo* olarak aktivasyonun belirteci olan CD4-pozitif T lenfositleri eksprese ederler ve aktivasyonları sırasında *in-vitro* olarak IFN- γ salgırlar [104]. IFN- γ , insan arterlerinde neointima oluşumunu arttırabilir [105] ve düşük-yoğunluklu lipoprotein reseptör yoksunu farelerde aterosklerotik plak oluşum seviyesinin genetik eksiklikle ilişkili olarak azaldığı vurgulanmıştır [106].

2.6. Ras Proto-Onkogen Ailesi

Ras proto-onkogen ailesi, memeli hücrelerinin farklılaşma ve büyümesini regüle eden birçok 21 kDa'luk guanin nükleotid-bağlayan proteinlerden oluşur [107]. Bu GTPazlar, mitojenezis sırasında büyüme-ilişkili gen ekspresyonlarının modülasyonlarını da içeren birçok hücre yüzey reseptör tirozin kinazların aktivasyonlarını eşleştirir [108, 109]. p21^{Ras} proteinleri GTP'i bağlayarak, intrinsek GTPaz aktivitesiyle bir GDP formu çevrimi üzerinden aktif konformasyona dönüşür [110]. Yeniden aktivasyon, serbest sitozolik GTP için GDP bağlanmasının değişimi tarafından gerçekleştirilir [111] (Şekil 2.7). Ras aktivitesini regüle eden iki protein ailesi saptanmıştır; GDP'nin salınımını katalizleyen guanin nükleotid-salınım faktörleri ile Ras inaktivasyonunu ve GTP hidrolizini çabuklaştıran GTPaz-aktifleyici proteinler [112].

Yabani-tip Ras'ın hücre içerisindeki miktarının fazla olması, NIH/3T3 hücre kültürlerinde onkojenik transformasyon ile ilişkili bulunduğu [113] gibi transgenik farelerde tümörlerin gelişmesinde de rol aldığı saptanmıştır [114]. Ras mutantlarının laboratuvar hayvanlarında [103] olduğu kadar insanlarda da [115] tümör oluşumuna katkı sağladığı vurgulanmıştır. Son yapılan çalışmalarda da, Ras'ın, VDKH'lerinde farklılaşma ve büyümenin kritik bir regülatuar molekül olduğu saptanmıştır [116]. Ras genindeki tek-nokta mutasyonu, intrinsek GTPaz aktivitesine veya guanin nükleotid değiştiricisine etki ederek, Ras'ın kalıcı aktivasyonuna ve uzun süreli bir mitojenik cevaba yol açar [107].

VDKH'lerinin c-Ha-Ras onkogeni ile transfeksiyonu, morfolojik değişimler, tutarsız büyüme, gelişmiş mitojenik cevapsızlık ve kazanılmış EGF cevapsızlığı ile karakterize bir transformasyon işlemi, uyarır [117]. c-Ha-Ras ile transfekte edilmiş VDKH'lerinde, α -düz kas aktin gen ekspresyonunun azalması, bu hücrelerin daha primitif bir hale doğru değişime uğradığının kanıtıdır [118]. Söylenenlerin ışığında, aterojenesis ve karsinojenesis arasında, VDKH'lerinde büyüme-ilişkili sinyal iletimini onkojenik Ras'ın etkileme kabiliyeti, Ras'ın aterojenik işlemde rol alabileceğini düşündürmektedir [118].



Şekil 2.7. Hücre içerisinde Ras'ın aktivasyonu. Hormonun bağlanması ve reseptör dimerizasyonuna bağlı olarak tirozin birimlerinden otofosforillenen reseptör (1) Büyüme faktör reseptörüne-bağlanan protein 2 (Grb2) ve Sos'un bağlanması ile inaktif Ras ile etkileşime girer (2). Sos molekülünün bağlanması Ras'dan GDP'nin ayrılmasını ve bunu takiben GTP bağlanması ve Sos'un ayrılması ile Ras aktiveleşir (3) [119].

Literatürdeki birçok veri, özellikle hücre yaşamsallığında ve hücresel davranışı etkileyen efektör yollarda Ras'ın kendisinin önemli bir rol oynayabileceği yönündedir. Feokromositoma hücre dizisi PC12 de yaşamsallıktan sorumlu olan sinyaller PI3-K aktivasyonuna bağlı olabilir ve Ras^{N17} tarafından dominant-negatif inhibisyonun yaşamsallığa etki etmediği görülmüştür [120]. Sadece Ras^{N17} tarafından dominant-negatif bir inhibisyonun PC12 hücrelerini apoptozisten korumak için yeterli olabileceğine inanılmaktadır [121], fakat bu iki çalışmadan elde edilen veriler bu noktada uyumsuzluk göstermektedir. Transforme fibroblastlarda, radyasyon-uyarımli apoptozis, esas aktif Ras'ın ekspresyonu tarafından engellenebilmiştir [122, 123]. Tam tersine, esas aktif Ras'ın ekspresyonu, geliştirilmiş hassasiyetteki tümör nekrozis faktör- α -uyarımli apoptozis ile bağlantılıdır [124]. Transforme fibroblastlarda tümör nekrozis faktör- α -uyarımli apoptozis, bFGF tarafından engellenmiştir ve bu koruma Ras^{N17}'nin ekspresyonu tarafından bozulmuştur [125]. Apoptozu uyaran birçok sinyal yolu, Bcl-2 ve Bcl-2'i uyaran esas aktif Ras'ın hücre içindeki miktarının artmasıyla inhibe edilmektedir ve hematopoetik hücrelerde büyüme faktörlerinin geri çekilmesi ile meydana gelen apoptozisten de korur [126].

MATERYAL ve METOD

3.1 Materyal ve Kimyasal Malzemeler

Hank's Balanced Salt Solutions (HBSS), kalsiyum klorid (CaCl_2), hepes, elastaz, kollejenaz, soya tripsin inhibitör, bovine serum albumin, fetal bovine serum, L-glutamin, penisilin-streptomisin, tripsin-EDTA (etilen diamin tetraasetik asit) ve Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Sigma'dan satın alındı.

Hücre kültüründe kullanılan petriler, flasklar ve 15 mL'lik plastik tüpler ile benzeri sarf malzemeler R&D Falcon firmasından satın alındı.

Medyum saklama amacıyla Simax marka otoklavlanabilir cam şişeler kullanıldı.

Hücre kültüründe aktivatör olarak kullanılan Anjiyotensin II ve Fas Ligand Sigma'dan, IFN- γ Santa Cruz'dan, inhibitör olarak kullanılan Wortmanin Santa Cruz'dan, AT2R blokörü PD123,319 ve PKC inhibitörü GF109203X Sigma'dan, NF- κ B inhibitörü olan IKK blokörü, Ras inhibitörü FPT III, EGFR ve PDGFR blokörleri (sırasıyla AG490 ve AG1295), Akt inhibitörü SH-5, PLC inhibitörü U73122 ve Src inhibitörü PP2 Calbiochem'den alındı. AT1 antagonisti Losartan, Merck Sharp&Dohme firması tarafından hediye edildi.

Kullanılan primer antikorlardan anti-p-Akt/PKB α ve anti-p-Bad Upstate firmasından, anti-c-H-Ras Calbiochem'den, monoklonal anti-Bcl-X_L, β -aktin ve Anti-Kaspas3 Sigma'dan ve bu antikorlara karşılık gelen sekonderlerden anti-mouse immün globülin (IgG) (Fc spesifik)-peroksidaz Sigma'dan ve goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP konjugat BioRad'dan temin edilmiştir.

pCH110 DNA'sı, Akdeniz Üniversitesi Fizyoloji AD. Öğretim görevlisi Prof. Dr. Uğur Yavuzer tarafından, Ras plazmidi de, Dr. Ernő Zador (University of Szeged Medicine Faculty, Dept. Of BioChem, Szeged) tarafından hediye edilmiştir.

Anneksin V ölçümü için kullanılan akış sitometresine uygun kit (Annexin V-FITC Apoptosis detection kit I) BD Pharmingen'den, spektrofotometrik kaspas-3 ölçümü için yararlanılan "Caspas-3 Cellular Activity Assay Kit" Calbiochem'den ve primer hücre kültürümüzün transfeksiyonunda Roche firmasına ait "FuGENE HD Transfection Reagent" kiti kullanılmıştır.

İmmünohistokimyasal analizler için Dako marka immünohistokimya kiti kullanıldı. İmmünohistokimya için kullanılan primer ve sekonder antikorlar Sigma'dan alındı.

Protein ölçümleri için Pierce marka micro protein deney kiti kullanıldı.

Western blot için Bio-Rad marka Mini-Protean Western Blot setinden yararlanıldı.

Sinyallerin saptanmasında kemilüminesan olarak Bio-Rad kitinden faydalanıldı.

Membran olarak 0,2 ve 0,45 µm por genişliğindeki Whatman Protran marka nitroselüloz membran kullanıldı.

Membranlar filme aktarılırken Amersham marka yüksek kaliteli film kullanıldı. Filmlerin geliştirilmesi esnasında Illugater marka developer ve fiksatif kullanıldı.

Metanol Merck'den alındı.

3.2 Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler

Buzdolabı	: Beko 9610NM, Vestel NT 465 HG (+4°, -20° C)
Soğutucu	: Bosch (-20° C)
Dondurucu	: Hettich HS 2486 (-80° C)
Sıcak su banyosu	: Raypa (20° ~ 80° C)
Santrifüj	: Beckman & Coulter Microfuge 22R (+4° C)
Santrifüj	: NÜVE NF400
İnkübatör	: Heraeus HeraCell 150 [Karbon dioksit (CO ₂), 37°]
Kültür kabini	: Bilser
Mikroskop	: Olympus CKX41 (Inverted)
Görüntüleme	: Olympus imaging Corr-dijital kamera E330
Sonikatör	: Bendelin UW2070
Karıştırıcı	: LabLine Thermal Rocker (kapaklı, 37° C)
Karıştırıcı	: Biometra WT17
Karıştırıcı	: Heidolph MR Hei-Standart Q-02 (manyetik)
Thermoblock	: Biometra TB1
Hassas terazi	: Presica XB220A
Kaba terazi	: Kern 440-43N
pH metre	: Hanna pH211
Akış Sitometresi	: BD FACSCanto II
Spektrofotometre	: BİOTEK µQuant (96-kuyucuk okuyuculu)

Plastik ve cam malzemeler Akdeniz Üniversitesi Sterilisasyon Merkezinde steril edildi.

Deneyde kullanılan 250-350 g ağırlığındaki erkek wistar ratlar ve bunlardan elde edilen düz kas hücrelerinin izolasyonu, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden sağlanıp, gerçekleştirilmiştir.

Primer hücre kültürü işlemleri, spektrofotometrik protein ve kaspas-3 ölçümleri, İmmünohistokimya ve Western Blot teknikleri Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapılırken, Anneksin V ölçümleri Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında yapılmıştır.

3.3 Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu [127]

Laboratuvarımızda, gerçekleşmiş ve halen yürütülmekte olan projeler çerçevesinde, kullanılmakta olan hücre kültürü, immünohistokimya ve Western blot teknikleri için aşağıda yazılan tekniklere ait prosedürler bire bir uygulanmaktadır.

3.3.1 Kullanılan Solüsyonlar

Transfer Medyumu

Solüsyon 0,2 mM olacak şekilde (2,94 mg CaCl_2 /10 mL HBSS) hazırlandı. Çözelti steril 0,22 μm 'lik filtrelerden geçirildi ve 88 mL steril HBSS eklenip üzerine total hacimde % 2 oranında 2 mL penisilin-streptomisin (P-S) antibiyotiği ilave edilip final hacim 100 mL'ye tamamlandı ve + 4° C'de saklandı.

Enzimatik Ayırma Solüsyonu (EAS)

Final hacim 4 mL olacak şekilde steril HBSS solüsyonu içerisinde [Ca^{+2} -magnezyum (Mg^{+2}) içermeyen] 0,2 mM Ca^{+2} (CaCl_2), 15 mM (N-[2-Hidroksietil]piperazin-N'-[2-etansülfonik asit]) (HEPES) (pH: 7,2-7,3), 0,0625 mg/mL elastaz, 0,25 mg/mL soya tripsin inhibitör (STİ), 0,5 mg/mL kollajenaz, 2,0 mg/mL sığır serum albumin (BSA) çözüldü. Bunun için aşağıdaki stok solüsyonlar hazırlandı.

- ➔ **CaCl_2 :** Solüsyon 0,2 mM olacak şekilde, 10 mL HBSS solüsyonu içerisinde 2,352 mg CaCl_2 çözüldü. Çözelti 0,22 μm 'lik steril filtreden geçirildi ve steril olarak +4° C'de saklandı. Final hacim 4 mL olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 0,5 mL alınıp enzim ayırma solüsyonuna eklendi.
- ➔ **HEPES:** Solüsyon 15 mM olacak şekilde, 10 mL HBSS içerisinde 143,1 mg hepes çözüldü. Çözelti 0,22 μm 'lik steril filtreden geçirildi ve steril olarak +4° C'de saklandı. Final hacim 4 mL olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 1 mL alınıp enzim ayırma solüsyonuna eklendi.
- ➔ **Elastaz:** Steril toz şeklinde bulunan 5 mg tip E pankreatik elastaz (90 U), 5 mL HBSS'de çözülür. Stok solüsyon, 10 adet 0,5 mL'lik steril plastik tüplere bölündü ve -20° C'de saklandı. Her plastik tüp 2 kullanımlık olacak şekilde ayarlandı. Her tüpte 0,0625 mg/mL elastaz olacak şekilde, 250 μl stok solüsyon enzim ayırma solüsyonu ile 4 mL'ye tamamlandı.
- ➔ **STİ: Solüsyon** 0,25 mg/mL olacak şekilde, 5 mL HBSS solüsyonu içerisinde 5 mg STİ Tip I-S tartılıp çözüldü. Çözelti 0,22 μm 'lik steril filtreden geçirildi

ve +4° C’de saklandı. Final hacim 4 mL olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 1 mL alınıp enzim ayrışma solüsyonuna eklendi.

➔ **Kollajenaz Tip I-A:** Steril toz şeklinde bulunan 100 mg kollajenaz (125 U), 12,5 mL HBSS’de çözüldü. Stok solüsyon 25 adet 0,5 mL’lik steril plastik tüplere bölündü ve -20° C’de saklandı. Her tüp 2 kullanımlık olarak ayarlandı. Her tüpte 0,5 mg/mL kollajenaz olacak şekilde, 250 µl stok solüsyon, enzim ayrışma solüsyonu ile 4 mL’ye tamamlandı.

➔ **Sığır Albümin:** Solüsyon 2 mg/mL olacak şekilde, 5 mL HBSS solüsyonu içerisinde 80 mg albümin tartılıp çözüldü. Çözelti 0,22 µm’lik steril filtreden geçirildi ve +4° C’de saklandı. Final hacim 4 mL olacak şekilde her kullanımda bu stoktan 0,5 mL alınıp enzim ayrışma solüsyonuna eklendi.

Bu stoklardan alınan hacimler, final hacim 4 mL olacak şekilde Tablo 3.1’deki gibidir.

Tablo 3.1: Enzimatik Ayrışma Solüsyonu Bileşenleri ve Miktarları

STİ	HEPES	Ca ⁺²	BSA	ELASTAZ	KOLLEJENAZ	HBSS	TOPLAM
1 mL	1 mL	0,5 mL	0,5 mL	250 µL	250 µL	0,5 mL	4 mL

3.3.2 Metod

Hücrelerin İzolasyonu

Ratlar, steril koşullar altında eter anestezisi uygulanarak torasik aorta ve abdominal aortanın üst kısmı disseke edildi. Aorta buz içindeki steril bir petri kabı içine alındı. Petriye transfer medyumu konuldu. Enjektöre çekilen 5 mL transfer medyumu ile aortanın iç çeperi yıkandı. Bu sayede kan ortamdan uzaklaştırıldı. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler ultra viole (UV) ile steril edilmiş ayrı bir odada, buz içinde ve disseksiyon mikroskobu altında, steril mikro-cerrahi set yardımıyla yapıldı. Aorta segmenti transfer medyumu içeren temiz bir parafinli petri kabına alındı. Aorta boyuna olacak şekilde toplu iğneler yardımıyla parafin bloğa tutturuldu. Disseksiyon mikroskobu altında steril mikro doku makası ve ince uçlu pens yardımıyla aortanın dış kısmındaki yağlar ve venöz yapılar temizlendi. Aorta boyuna kesildi ve dikdörtgen şeklinde açılarak hafif gerilmiş vaziyette uçlarından toplu iğneler ile parafin bloğa tutturuldu. Aortanın dış kısmındaki kılcal damarlar kesilerek alındı. Kalan yağ parçaları tamamen temizlendikten sonra steril bir bistüri yardımıyla aortanın dışı kazındı. Yaklaşık olarak aortanın dıştaki 1/3’lük kısmı bu şekilde temizlendi. Bu sayede, dış damar duvarındaki adventisya dokusu ortamdan uzaklaştırıldı. Disseksiyon mikroskobu altında adventisya dokusu ortamdan uzaklaştırdıktan sonra petri kabı içerisindeki aortun iç kısmı pamuklu bir çubuk ile hafifçe sıyrıldı. Bu işlem birkaç kez tekrarlandı. Bu sayede aortun lümenine bakan tek katlı epitel dokusu ortamdan uzaklaştırıldı. Adventisya ve endotel ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra aorta transfer medyumu ile yıkandı ve içinde steril transfer

medyumu bulunan 1,5 mL’lik plastik tüpe alındı. Plastik tüp buz içinde hücre kültürünün yapıldığı ortama taşındı.

3.4 Primer Aortik Düz Kas Hücrelerinin Kültürü [128]

3.4.1 Kullanılan Solüsyonlar

Hank’s Balanced Salt Solution (HBSS, Dengeli Tuz Solüsyonu)

Kalsiyum ve magnezyum içermeyen HBSS solüsyonu 0,4 g/L potasyum klorid, 0,06 g/L potasyum fosfat, 8,0 g/L sodyum klorid, 0,04788 g/L sodyum fosfat, 1,0 g/L D-glukoz içermektedir.

1X Trypsin-EDTA

Solüsyon % 0.05 (w/v) Trypsin ve 0.02% (w/v) EDTA içermektedir.

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu

100 mL solüsyon, 10,000 U penisilin, 10 mg streptomisin içermektedir.

Medyum (Besi Yeri) Hazırlanması

Besi yeri olarak DMEM kullanıldı. Solüsyon 425 mL medyum üzerine 50 mL fetal sığır serum (FBS) (%10), 5 mL (%1 v/v) penisilin-streptomisin, L-glutamin 0,584 g/L olacak şekilde, 20 mL saf DMEM’de çözülerek hazırlandı. Solüsyon steril filtrelerden geçirildi ve her şişeye 10 mL konuldu. Konsantrasyonu 25 mM olacak şekilde 5,9625 g HEPES tartıldı ve 20 mL saf DMEM içinde çözülüp steril filtrelerden geçirildi. Her şişeye 20 mL konuldu. Sonuçta toplam 500 mL’lik besi yerleri hazırlandı.

3.4.2 Metod

Düz Kas Hücrelerinin Kültürü

Plastik tüp içindeki temiz aorta ve transfer medyumu steril kültür kabini içerisinde 15 mL’lik doku petrilere transfer edildi. Transfer medyumu otomatik pipet ile çekilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Aorta iki adet steril bistüri yardımıyla toplu iğne başı büyüklüğünde küçük parçalara ayrıldı. Bu sayede enzimle reaksiyona girecek olan dokunun yüzey alanı artırılmış oldu. Daha önceden hazırlanmış ve 37° C sıcaklığa getirilmiş 4,0 mL EAS petriye eklendi. Petrinin etrafı parafilm ile sarıldı ve 37° C’lik etüvde, 45 dakika hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Bu süre içerisinde düz kas dokusu enzimler yardımıyla düz kas hücrelerine ayrıştırılmaya çalışıldı. 45 dakika sonunda petri etüvden çıkarıldı ve steril kültür kabini içerisine alındıktan sonra 10 mL’lik plastik enjektöre çekilen doku süspansiyonu 5-6 kez 14 µm’lik çelik uçlu kanülden geçirilir. 14 µm’lik metal kanül düz kas hücrelerinin mekanik etkiyle birbirinden ayrılmasını kolaylaştırmak için kullanıldı. Petri kabına EAS’nin 2 katı (8 mL) medyum eklendi. Bu sayede enzim konsantrasyonu dilüe edilmiş oldu. Toplam hacmi 12 mL olan hücre süspansiyonu 15 mL’lik steril plastik tüplere alındı ve 200g’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra steril ortamda süpernatant kısmı tamamen çekilerek atıldı. Dipteki pellet 10 mL medyum ile tekrar resüspanse edildi.

200g'de 5 dakika santrifüj edildi ve üstteki süpernatant atıldı. Bunun amacı ortamda dilüe halde kalan ve dokuyu yıkan enzimleri (elastaz, kollejenaz) tamamen ortamdaki uzaklaştırmaktır. Hücre pelletleri ısı ile inaktive edilmiş 3 mL DMEM ile resüspanse edildi. Bu hücre süspansiyonu 12,5 cm²'lik doku kültür flaskına transfer edildi. Bu flask 37° C'de nemlendirilmiş %5 CO₂-% 95 atmosfer hava içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin tutunmalarını kolaylaştırmak için ilk 24 saat hücrelere dokunulmadı. Primer kültür 2. günden itibaren rutin olarak her gün invert kontras mikroskopi ile incelendi. İlk hücrelerin flaskta görünmesi için 3-5 gün beklendi. Bu zaman içerisinde hücrelerde herhangi bir enfeksiyonun olup olmadığı kontrol edildi. İlk hücreler tutunmuş olarak flaskta görüldüğü gün veya en geç 4-5. günün sonunda ortamdaki doku yıkıntıları ve hücre atıklarını ortamdaki uzaklaştırmak için bir defaya mahsus olmak üzere hücreler 3 mL medyum ile bir kez yıkandı. Daha sonra hücreleri taze medyum ile beslemek amacıyla 5 mL 37° C sıcaklıkta medyum eklendi. Medyumlar 24-72 saat aralıklar ile rutin olarak değiştirildi.

Hücrelerin Pasajlanması (Tripsinizasyon)

Pasajlanacak olan hücrelerin bulunduğu kültür kabının medyumunu çekildi. Hücreler 37° C'ye getirilmiş 5 mL HBSS ile 1 kez yıkandı. HBSS aspire edildi. 5 mL 1X tripsin-EDTA flaskta konuldu ve 37° C'lik etüvde 5 dakika inkübe edildi. Üzerine 5 mL medyum eklendi ve hafifçe çalkalandı. Steril pipet yardımıyla 10 mL'lik solüsyon 15 mL'lik plastik santrifüj tüpüne alındı. 200'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve dipteki pelet 1 mL medyum ile süspanse edildi. Bölünecek flask sayısına göre her bir flaskta 5 mL medyum olacak şekilde medyum eklendi ve flasklara bölündü. Bölünen flaskların 24 saat sonra medyumları değiştirildi.

Hücre Sayımı ve Hücre Canlılığı Testi

Hücre kabı içerisindeki hücreler tripsinize edildi ve santrifüj sonrası dipte oluşan pellet 3 mL medyum ile süspanse edildi. 100 µl hücre süspansiyonu, 100 µl % 0,5'lik tripan blue ile süspanse edildi. Hücreler thoma lamına alındı ve mikroskopta 20X'lik büyütmeyle incelendi. Membranı mavi boyanan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı olarak kabul edildi.

Hücre sayımı için dipte kalan pellet 1 mL medyum ile süspanse edildi. Süspansiyondan thoma lamına damlatıldı ve 5 farklı alan sayılıp toplandı. Toplam sayı 5'e bölündü ve çıkan değer 10⁶ ile çarpılıp 1 mL'deki hücre sayısı hesaplandı.

3.5 Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu

3.5.1 Hücrelerin İmmünohistokimya Preparatları Haline Getirilmesi

Deneyde kullanılan lamlar % 70' lik alkolden geçirildi. Distile su ile yıkandı, kurutuldu ve otoklavlandı. Steril lamlar üzerine steril ortamda 2 alan işaretlendi. 25 cm²'lik hücre flaskı tripsinize edildi ve santrifüj sonrası dipte kalan pellete 2 mL medyum eklenildi ve resüspanse edildi. İşaretli alanlara bu süspansiyondan 100 µl ekildi. Lamlar büyük steril petrilere konuldu ve ağzı kapalı olacak şekilde etüvde inkübe edildi.

Preparatların bir gün sonra medyumunu değiştirildi ve hücre yoğunlukları kontrol edildi. Hücreler tamamen cama tutunduktan ve yüzeyi kapladıktan sonra hücre medyumunu çekildi ve Ca^{+2} - Mg^{+2} içermeyen HBSS ile yıkandı. Steril PBS ile tekrar yıkanan lamalar oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar -20°C 'ye kaldırıldı. Preparat üzerinde tutunan hücre olup olmadığını anlamak için hemotoksilen eozin boyasıyla preparatların bir kısmı boyandı ve hücre dağılımlarına bakıldı.

İmmünohistokimyasal analizler için preparatlar 4 gruba ayrıldı.

1. Vasküler düz kas hücrelerini göstermek için α - aktin primer antikorun 1/800 ve 1/1600 dilüsyonu çalışıldı.
2. Endotel hücrelerini göstermek için Von Willebrand faktör primer antikorunun 1/500 ve 1/1000 dilüsyonu çalışıldı.
3. İzotip kontrol için sekonder antikor olan fare kaynaklı IgG 2a'nın 1/800 ve 1/1600 dilüsyonları çalışıldı.
4. Normal boyama kontrolü için PBS ile kontrol grubu çalışıldı.

3.5.2 Kullanılan Solüsyonlar

İmmünohistokimya için hazır kit, düz kas boyamaları için fare kökenli düz kas spesifik α -aktin antikor, endotel boyamaları için fare kökenli Von Willebrand faktör antikor, antikor dilüsyonları için antibody dilüent, sekonder antikor olarak da fare kökenli horse radish peroksidaz enzimiyle işaretli IgG2a antikor kullanıldı.

TBS Stok Solüsyon (Tris Buffer salin, 10 X konsantre)

TBS solüsyonu hazırlamak için 60,55 g Tris, 87,66 g NaCl 800 mL distile suda çözündü. Solüsyonun pH'sı HCl ile 7,4'e ayarlanır. Final hacim 1000 mL olarak distile su ile tamamlandı.

TBS (1 X)

TBS stok solüsyondan (10 X) 100 mL alınıp 1 L'ye tamamlandı.

3.5.3 Metod

İmmünohistokimyasal analiz için aşağıdaki protokol takip edildi.

- ➔ Hazırlanan preparatlar aseton tanklarına konuldu ve 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- ➔ Aseton tanklarından çıkarılıp 20 dakika oda ısısında kurutuldu.
- ➔ TBS ile oda ısısında 3 kez 5 dakika yıkandı.
- ➔ 5 dakika bloklama solüsyonuyla bloklandı.
- ➔ Primer antikor damlatılıp 45 dakika beklendi.
- ➔ 3 kez TBS ile 5 dakika yıkandı.
- ➔ Sekonder antikor eklenip 30 dakika beklendi.
- ➔ 3 kez TBS ile 5 dakika yıkandı.
- ➔ Sekonder antikora bağlanması için enzim (biyotin- HRP kompleksi) verildi ve 30 dakika inkübe edildi.
- ➔ Enzime Amino Etil Karbizol (AEC) substratı verilip 3-5 dakika inkübe edildi.

- ➔ Preparatlar TBS ile yıkandı, kurutuldu ve kayser jelatin ile kapatılıp karanlıkta buz dolabında saklandı.

Preparatlar mikroskop altında incelenip fotoğraflandı.

3.6 VDKH Kültürlerinin Western Blot Analizi İçin Lizatlarının Hazırlanması

3.6.1 Kullanılan Solüsyonlar

Enzim Ayırışma Tamponu

Enzim ayırışma tamponu 25 mM Tris hidroklorik asit (HCl), pH 7,4, %1 Triton X-100, %10 Gliserol, 10 mM sodyum pirofosfat, 50 mM sodyum florür (NaF), 1 mM sodyum orto-vanadat (Na_3VO_4), 1 mM Fenilmetilsülfonil florid (FMSF), 10 µg/mL Leupeptin içermektedir.

PBS (Fosfat Tamponlu Salin, 10X konsantre)

10 X konsantre PBS için 2 g potasyum klorür (KCl), 80 g sodyum klorür (NaCl), 14,4 g disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), 2 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tartılıp 1L distile suya tamamlandı. pH'sı 7,4'e ayarlanır. Kullanım esnasında 1:10 oranında sulandırıldı.

Triton X-100 Tamponu

- 200 mL 0.5 M NaF
- 50 mL 1 M HEPES
- 50 mL 3 M NaCl
- 2 mL 0.5 M MgCl_2 (Magnezyumklorid)
- 4 mL 0.25 M EGTA [Etilenbis (oksietilennitrilo) tetraasetikasit],
- 10 mL 0,1 M PMSF
- 10 mL 0,1 M Na_3VO_4
- 20 mL 0,5 M Pirofosfat
- 10 mg/mL'lik Leupeptin'den 1 mL
- 10 mg/mL'lik Aprotinin'den 1 mL
- 10 mg/mL'lik Pepstatin-A'dan 100 µL
- 100 mL % 10'luk Gliserol
- 12 mL Triton X-100

Triton X-100 tamponu, yukarıdaki malzemelerin tümüne son hacim 1L olacak şekilde bidistile su ilavesi yapılarak hazırlandı.

3.6.2 Kullanılan Aktivatörler

Anjiyotensin II

Toz halindeki 1 mg Ang II 9,5 mL distile suda çözüldü (1×10^{-4} M) ve 100 μ L'lik alikuatlara bölünüp -20° C'de saklandı. Kullanım esnasında 2 mL serum içermeyen medyuma 100 nM konsantrasyon için 20 μ L eklendi.

IFN- γ

100 μ g liyofilize protein ihtiva eden katı madde, 20 mL 1X PBS de çözülerek 5000 ng/mL'lik ana stok hazırlandı. Ana stoktan 4 mL çekilerek 1X PBS ile 10 mL'e tamamlanarak 2000 ng/mL'lik ara stok elde edildi. Buradan hazırlanan 200 μ L'lik alikuatlar ana stok ile birlikte -20° C'de saklandı. Kullanım esnasında 2 mL'lik total serum içermeyen hacimde 80 μ g IFN- γ konsantrasyonunu kullanabilmek amacıyla, her seferinde 80 μ L çekilerek ortama uygulandı.

Fas-L

50 μ g liyofilize protein ihtiva eden katı madde, 500 μ L 1X PBS (%1 BSA içeren) de çözülerek, 100 μ L'lik mL'sinde 100 μ g protein içerecek şekilde hazırlandı ve -20° C'de muhafaza edildi. Elde edilen alikuatlardan 25 μ L kullanılarak 2 mL'lik total serum içermeyen hacimde 1,25 μ g Fas-L ortama tatbik edildi.

3.6.3 Kullanılan İnhibitörler

Losartan

Toz halindeki losartan 4,6201 mg tartılıp 10 mL PBS içinde çözüldü (10^{-3} M). 500 μ L'lik alikuatlara bölünüp -20° C'de saklandı. İnhibisyon ortamında 10^{-5} M olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.

Wortmanin

Toz halindeki 1 mg wortmanin önce 10 mL DMSO içerisinde çözüldü ($2,334 \times 10^{-6}$ M). Ardından bu ana stoktan 40,000 nM'lık ara stoklar hazırlanıp 25 μ L'lik alikuatlara bölünüp -20° C'de saklandı. İnhibisyon ortamında 100 nM olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.

GF109203X (PKC inhibitörü)

Toz halindeki 1 mg katı madde, 2 mL DMSO'da çözülerek 1212,2 μ M'lık stok solüsyonu hazırlanarak 20 μ L'lik alikuatlar halinde -20° C'de saklandı. Kullanım esnasında 2 mL total serum içermeyen hacimde 2 μ M'lık konsantrasyonu sağlayabilmek amacıyla, her seferinde ortama 3,3 μ L verildi.

U73122 (PLC inhibitörü)

Toz halindeki 5 mg katı madde, 10 mL %70'lik etanolda çözülerek 1076 μ M'lık stok solüsyonu hazırlandı ve 200 μ L'lik alikuatlar halinde -20° C'de

saklandı. Kullanım esnasında 2 mL total serum içermeyen hacimde 10 µM'lık konsantrasyonu sağlayabilmek amacıyla, her seferinde ortama 19 µL verildi.

PD123,319 (AT2R blokörü)

Toz halindeki 10 mg katı madde, 5 mL distile suda çözülerek 2715 µM'lık stok solüsyonu hazırlandı ve 100 µL'lik alikuatlar şeklinde -20° C'de muhafaza edildi. Deney esnasında 2 mL total serum içermeyen hacimde 10 µM'lık konsantrasyonu sağlayabilmek amacıyla, her seferinde 7,4 µL ortama verildi.

FPT III (Ras inhibitörü)

Toz halindeki 1 mg katı madde, 1 mL distile suda çözülerek 2019 µM'lık stok solüsyonu hazırlandı. Buradan elde edilen 50 µL'lik alikuatlar -20° C'de saklandı. Deney esnasında 2 mL total serum içermeyen hacimde 10 µM'lık konsantrasyonu sağlayabilmek amacıyla, her seferinde ortama 9,9 µL verildi.

SH-5 (Akt inhibitörü)

1 mg olarak satın alınan madde, 500 µL DMSO'da çözülerek 3340 µM'lık stok solüsyonu hazırlandı. -20° C'de, 60 µL'lik alikuatlar şeklinde saklanan inhibitör, uygulama esnasında 2 mL total serum içermeyen hacimde 20 µM'lık konsantrasyonu elde edebilmek amacıyla, her seferinde ortama 12 µL verildi.

AG490 (EGFR blokörü)

5 mg'lık toz halindeki madde, 5 mL DMSO'da çözülerek 3400 µM'lık stok solüsyonu hazırlandı ve 100 µL'lik alikuatlar şeklinde -20° C'de muhafaza edildi. Kullanım esnasında 2 mL total serum içermeyen hacimde 10 µM'lık konsantrasyonu sağlayabilmek için, her seferinde 6 µL ortama verildi.

PP2 (Src inhibitörü)

Toz halindeki 1 mg katı madde, 2 mL DMSO'da çözülerek 1656750 nM'lık stok solüsyonu hazırlandı. 50 µL'lik alikuatlara bölünen çözelti -20° C'de korundu. Deney esnasında 2 mL total serum içermeyen hacimde 10000 nM'lık konsantrasyonu elde edebilmek için, her seferinde 12,1 µL ortama verildi.

AG1295 (PDGFR blokörü)

Toz halindeki 5 mg katı madde, 4 mL DMSO'da çözülerek 5335,05 µM'lık stok solüsyonu hazırlandı ve 20 µL'lik alikuatlar halinde -20° C'de korundu. Kullanım esnasında, 2 mL total serum içermeyen hacimde 10 µM'lık konsantrasyonu sağlayabilmek için, her seferinde ortama 3,8 µL verildi.

3.6.4 Metod

Düz kas hücreleri 6-kuyucuklu petrilere pasajlandı ve % 80 yoğunluğa gelinceye kadar rutin olarak beslendi.

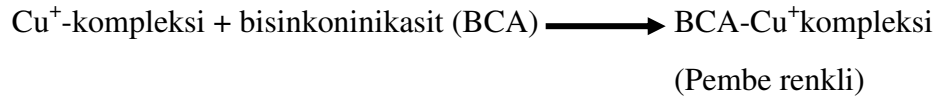
1. Yoğunluğu % 80'e gelen hücreler serum içermeyen DMEM ile bir kez yıkandı.

2. Serum içermeyen 2 mL DMEM (pH 7,4) hücrelere eklendi ve 24 saat inkübe edildi.
3. 6 kuyucuklu petrilere deneye uygun inhibitör ve aktivatörler ile belirli zaman periyotlarında inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyonu bitirmek için buz üzerinde medyum hızlı bir şekilde aspire edildi.
5. 1 mL 1X PBS ile 2 kez yıkandı ve PBS ortamdan uzaklaştırıldı.
6. 200 µL buz soğukluğunda ayrışma tamponu eklendi.
7. Hücreler kuyucuklardan özel hücre kazıyıcısı yardımıyla kazındı ve plastik tüplere toplandı.
8. Ultrasonik homojenizatör ile 9000 rpm'de 5 saniye sonike edildi.
9. Santrifüjde +4° C'de 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
10. Temiz süpernatant kısmı western analizi için kullanıldı.

3.7 Protein Miktarının Tayin Edilmesi

3.7.1 Mikro BCA (Bisinkoninikasit) Deney Kitinin Prensipli

Proteinlerin peptid bağları OH⁻ iyonu varlığında Cu⁺² iyonlarıyla reaksiyona girip Cu⁺-kompleksi oluşturur. Cu⁺-kompleksi bisinkoninikasit ile reaksiyona girerek pembe renkli BCA- Cu⁺ kompleksini oluşturur. Oluşan pembe renk 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunur.

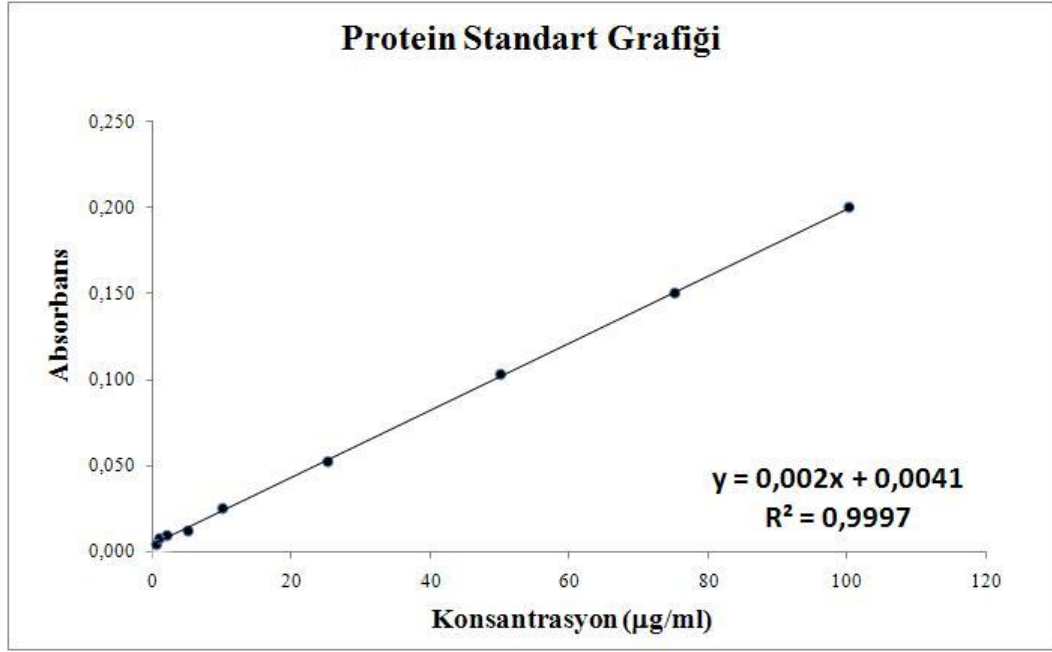


3.7.2 Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Grafiğin Hazırlanması

BSA 0,2 mg/mL olarak kitin içinde hazır verildi. Bu stoktan dilüsyonlar yapılarak standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar 200 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL'dir.

Protein ölçümü için kitin içinde hazır olarak verilen MA, MB, MC solüsyonları 25:24:1 oranında karıştırılarak çalışma solüsyonu (WR) hazırlandı.

96- kuyucuklu petrilere 100 µl standart ve 100 µl WR pipetlenerek karıştırıldı ve 37° C'de 2 saat inkübe edildi. 2 saat inkübasyon sonrasında standartlar kendi körüne karşı 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede aynı anda okundu. Tüm protein standartları çift çalışıldı ve sonuçların ortalamaları alındı. Okunan absorbans değerlerine göre standart grafiği çizildi (Şekil 3.1). Elde edilen doğru yardımıyla sonuçlar mililitredeki mikrogram protein miktarı olarak saptandı.



Şekil 3.1. Protein standart grafiği

3.7.3 Numunelerin Protein Miktar Tayini

Hücre kültürlerinden hazırlanan lizatlar protein tayini için kullanıldı. Hazırlanan her bir lizattan 5 µl alınıp 95 µl distile su ile tamamlanıp numune 1:20 oranında dilüe edildi. 100 µl numune üzerine 100 µl WR pipetlendi ve 37° C’de 96-kuyucuklu petrielerde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda numuneler çift kontrollü olarak spektrofotometrede 562 nm’de körüne karşı okundu. Elde edilen absorbans değerleri, standart grafiğin yardımı ile örneklerin mililitresindeki mikrogram protein miktarının tayininde kullanıldı.

3.8 Akt/PKB ve Bad Fosforilasyonunun, Ras Miktar Tayininin ve Bad/Bcl-X_L Kompleks Oluşumunun İmmünpresipitasyon, SDS-PAGE ve Western İmmünoblot Analizi

Rat aortik düz kas hücre kültürlerinde Ang II uyarımı sonrasında Akt/PKB ve Bad fosforilasyonu ve Ras miktarının saptanmasında AT1, EGF ve PDGF reseptör blokörleri (sırasıyla; Losartan, AG490 ve AG1295), PI3-K spesifik inhibitörü wortmanin, Ras inhibitörü FPT III, PKC inhibitörü GF109203X, PLC inhibitörü U73122, NF-κB IKK blokörü wedelolactone ve Src inhibitörü PP2’nin rolü Western blot tekniği uygulanarak belirlendi. Bcl-X_L antikoru ile inkübe edilmiş hücre lizatlarında fosfo-Bad antikoru ile oluşturduğu kompleksin gösterimi ve yine bu kompleks üzerine yukarıda belirtilen inhibitörlerin etkisi Western blot tekniği ile ifade edilmiştir.

3.8.1 Bad/Bcl-X_L İmmünpresipitasyonu

Kullanılan Solüsyonlar

Redüklenmemiş Numune Tamponu (Loading Dye, Laemli, 2X konsantre)

“Quality Biological, Inc” den alınmış bu solüsyon, tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS base), sodyum dodesil sülfat (SDS), bromfenol mavisi ve gliserol kullanılarak milipor suda çözündürülmüş ve 0,1 µm filtre membranlarından geçirilerek ürün steril hale getirilmiştir. Numune ile 1:2 oranında dilüe edilip kullanılmıştır.

Fosfat Salin Tamponu (PBS, pH 7,4)

SIGMA firmasından alınmış tablet halindeki tampon, içindeki bir adet tabletin 200 mL milipor suda çözündürülmesiyle elde edilmiştir.

Protein G-Sepharoz 4B Fast Flow, Recombinant Protein G

SIGMA firmasından alınmış agaroz-G bilyeleri %20 etanol içerisinde 2 mL’lik şişelerde gelmiştir.

İşlem

- Proteinleri eşitlenen lizatlara 1:100 oranında primer antikor ilavesi yapıldı (Bcl-X_L). Gece boyunca karıştırıcı üzerinde +4° C’lik oda içerisinde inkübasyonu gerçekleştirildi.
- Primer ile muamelenin ardından, aynı ortam içerisinde, lizatlara 30 µL bilyeler eklenerek (protein G-sefaroze 4B fast flow, rekombinant protein G, %20 etanol içerisinde) inkübasyona 2 saat daha devam edildi.
- +4° C’de, 4 dakika 1000 rpm de santrifüj edildi.
- Santrifüj akabinde elde edilen süpernatant atıldı (veya isteğe bağlı olarak bir defa daha deneyi tekrarlamak amacıyla saklanabilir).
- 3 defa 1X PBS (500 µL) ile +4° C’de, 4 dakika 1000 rpm de yıkandı.
- Son santrifüjün ardından süpernatant atılarak, pellete 10–20 µL 1X PBS ilave edilerek resüspanse edildi.
- Aynı hacimde 2X laemli eklenerek karıştırıldı ve 95° C’ de 5 dakika muhafaza edildi.
- Isıtılmış numuneler çıkarılıp tekrar karıştırıldıktan sonra oda ısısında soğutulularak, Western-blot yöntemi için kuyulara applike edilmek üzere hazırlandı (p-Bad ile).

3.8.2 Elektroforez Jelinin Hazırlanması

Solüsyonların Hazırlanması

Ayrıştırma jeli tamponu (Resolving Buffer) (1,5 M Tris pH 8,8):

Tris 9,085 g tartıldı ve 20 mL distile su içinde çözüldü, pH 1,5 M HCl ile 8,8’e ayarlandı ve final hacim 50 mL’ye tamamlandı. 0,2 g SDS tartılıp solüsyona eklenip çözüldü. Solüsyon +4° C’de saklandı.

Yükleme jeli tamponu (Stacking Buffer) (0,5 M Tris, pH 6,8):

Tris 6,05 g ve 40 mL distile su içinde çözüldü, pH 1N HCl ile 8,8'e ayarlandı. 0,4 g SDS tartılır ve solüsyonda çözüldü. Solüsyon +4° C'de saklandığında 1 ay stabildir.

Akrilamid – Bisakrilamid Solüsyonu:

Akrilamid 30 g ve bisakrilamid 0,8 g tartıldı, 100 mL distile su içinde çözüldü.

Amonyum persülfat (%10; APS):

Amonyum persülfat 50 mg tartıldı ve 0,5 mL distile su içinde çözünerek, taze hazırlandı.

TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamin)

Amonyum persülfattan serbest radikaller oluşmasını sağlayarak akrilamid ve bis akrilamidin polimerizasyonunu katalizleyen hazır solüsyon kullanıldı.

Jelin Hazırlanması ve Gerekli Kimyasalların Miktarı

Bu çalışmada, ayırışma ve yükleme kısımlarından oluşan iki farklı akrilamid jel kullanıldı. Akt/PKB, Bad ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu için %10'luk ayırışma jeli kullanılırken Ras miktarının belirlenmesi amacıyla %15'lik ayırışma jeli kullanılmıştır.

Ayırışma Jeli

%10'luk ve %15'lik olarak Tablo 3.2 de verilen miktarların karıştırılmasıyla elde edilmiştir.

Tablo 3.2 Ayırışma jeli tamponları ve miktarları

	<i>%10</i>	<i>%15</i>
Distile Su	3,125 mL	1,875 mL
Resolving buffer (pH: 8,8)	1,875 mL	1,875 mL
Akrilamid	2,5 mL	3,750 mL
% 10 APS	0,025 mL	0,025 mL
TEMED	0,005 mL	0,005 mL

Yükleme jeli (%5)

Tablo 3.3’de verilen miktarların karıştırılmasıyla elde edildi.

Tablo 3.3 Yükleme jeli tamponları ve miktarları

	% 5
Distile Su	1,525 mL
Stacking buffer (pH: 6,8)	0,625 mL
Akrilamid	0,325 mL
% 10 APS	0,0125 mL
TEMED	0,0025 mL

Jelin Dökülme İşlemi

- Jelin döküleceği camlar, üzerlerinde olabilecek partiküllerin jeli bozmaması ve proteinlerin düzgün bir şekilde yürümesini sağlamak için distile su ile yıkandı, % 70’lik alkolden geçirildi ve kurutuldu.
- Camlar hazır hale geldikten sonra ön ve arka cam birleştirildi ve kısıkaçlar yardımı ile sıkıştırıldı.
- Kısıkaçlara yerleştirilmiş camlar jelin sızıntısını engellemek için camların alt kısmı bantların üzerine gelecek şekilde dikey olarak yerleştirildi ve üsteki mandala tutturularak iyice sıkıştırıldı.
- Ayırışma jelinin ilk 3 solüsyonu karıştırıldı ve 5 dakika beklendi. 5 dakika bitiminde APS ve TEMED eklendikten hemen sonra jel karıştırılıp camlar arasına üstten 1-1.5 cm kalacak şekilde döküldü. TEMED polimerizasyon başlangıcında önemli bir rol oynadığından jel karışıma en son eklendi.
- Jelin hava ile temasını kesmek ve düzgün donmasını sağlamak için jelin üzerindeki boş bırakılan kısma distile su yavaşça döküldü.
- Jel oda ısısında yaklaşık 60 dakika sonra katılaştı. Üst jelin (yükleme jeli) ilk 3 solüsyonu karıştırıldı. Alt jelin üzerindeki distile su boşaltılarak kurutma kâğıdı ile kurutuldu.
- İki cam arasına 10 kuyucuklu tarak yerleştirildi. Üst jele, APS ve TEMED eklendi ve hızlı bir şekilde karıştırılarak iki cam plak arasına tarakların içinde hava kalmayacak şekilde döküldü.
- Üst jel oda ısısında tamamen donduktan (yaklaşık 20 dakika) sonra camlar kısıkaçların içerisinden çıkarıldı ve jel artıkları temiz bir kâğıt peçete ile silindi.
- Jelin içerisinde bulunduğu camlar üzerinde kutupların bulunduğu kısıkaçların içine yerleştirildi ve hemen elektroforez tankına alındı.

3.8.3 Elektroforez İşlemi

Solüsyonların hazırlanması

Redüklenmemiş Numune Tamponu (Loading Dye, Laemli, 5X konsantre)

Laemli tamponu için 10 mL gliserol, 10 mL % 10 SDS, 1,25 mL 1 M pH 6,8 Tris, 7,5 mL β -merkaptoetanol ve brom fenol blue karıştırılıp 50 mL distile suya tamamlandı. Numune ile 1:5 oranında dilüe edilir.

Çalışma Tamponu (Elektroforez Running Buffer, 5X Stok Solüsyon)

Tris 15 g, 72 gr Glisin, 5 g SDS tartılır, 1000 mL distile su içinde çözülür. Elektroforez aşamasında bu stok solüsyon 1:5 oranında dilüe edilmelidir.

Elektroforeze Konacak Örneklerin Hazırlanması

- Protein miktarları tayin edilmiş lizatlar -20° C'den alınarak buz içeren bir kaba konuldu.
- Örnekler çözündükten sonra kuyucuğa yüklenen 25 μ L içerisinde 5-15 μ g protein olacak şekilde her numuneden çekilip lizis tamponu ile 60 μ L'ye tamamlandı. Üzerine 15 μ L 5X laemli sample buffer pipetlendi. Örnekler boya ile iyice karıştırıldı.
- Hazırlanan örnekler 5 dakika kaynatıldı. Bu işlem esnasında plastik tüplerin kapaklarının açılmaması için etrafı parafilm ile sarıldı.

Elektroforez İşlemleri

- Elektroforez tankı, elektroforez tamponu ile dolduruldu ve camlar arasındaki taraklar çıkartıldı. Tarağın oluşturduğu kuyucukların içerisine girebilecek ince uçla enjektör ile hava pipetlenerek kuyucuklar temizlendi.
- İlk kuyucuğa molekül ağırlıkları bilinen proteinlerden oluşan karışım pipetlendikten sonra diğer kuyucuklara da örnekler yüklendi.
- Örneklerin yüklenmesi tamamlandıktan sonra uygun kutuplar bağlanarak tankın kapağı kapatıldı. Tank güç kaynağına bağlandı ve akım 80 V, 65 mA ayarlanarak elektroforez edildi.
- Yükleme boyası jelden çıktığında elektroforez sona erdirildi. Bu süre yaklaşık 2 saat kadar sürdü.
- Yükleme jeli kesilerek atıldı.
- Proteinleri içeren ayırma jeli protein transfer tamponuna konuldu. Bu aşamadan sonra jel, proteinlerin membrana transferi için hazır hale geldi.

3.8.4 Elektroforez Jelinin Membrana Aktarılması

Solüsyonların Hazırlanması

Blotlama Tamponu (Blotting Buffer 1 L, 10X stok solüsyon)

Tris 12,11 g, 30 g Glisin, 1 g EDTA tartıldı ve 1 L distile suda çözülür. Kullanım esnasında 10X tampon 1X haline dönüştürülürken % 10 metanol eklendi.

Metanol

Transfer sırasında membranın şişmesi ve yapışan proteinlerin korunabilmesi için gereklidir.

İşlemler

- Nitrosetüloz membran, kurutma kağıtları ve süngerler buz soğukluğundaki blotting tamponu ile ıslatıldı ve 2-5 dakika tamponda bekletildi.
- Sandviç aparatının arasına gelecek şekilde en alta (-) kutup olmak şartıyla, transfer tamponu ile doyurulmuş sünger konuldu.
- Süngerin üzerine yine transfer tamponu ile doyurulan 3 adet kurutma kağıdı konuldu.
- Transfer kağıdının üzerine alt ve üst kısımlarına dikkat edilerek jel yerleştirildi.
- Jel üzerine nitrosetüloz membran yerleştirildi.
- Üzerine 3 adet daha transfer tamponu ile doyurulan kurutma kağıdı konuldu.
- Son olarak üzerine transfer tamponu ile doyurulan bir sünger daha konuldu ve bir silindir yardımı ile sandviçin içindeki hava kabarcıkları alındı. Sandviç aparatı üzerinden sıkıştırılarak kapatıldı.
- Hazırlanan sandviçin anot kutbu anota, katot kutbu katoda bakacak şekilde, elektroforez tankına yerleştirildi. Tank blotlama tamponu ile dolduruldu.
- 1,5 saat +4° C'de 80 V' ta ve yaklaşık 350 mA' de manyetik balık ve manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak ve her 30 dakika bir buz kabı değiştirilerek yürütüldü.
- 1,5 saat sonra sandviç tanktan çıkartıldı ve böylece membran antikör ile işaretlemeye hazır hale getirildi.

3.8.5 Membranların Antikörle İşaretlenmesi

Solüsyonların Hazırlanması

TBS Stok Solüsyon (Tris Buffer Salin, 10X konsantre)

TBS solüsyonu hazırlamak için 60,55 g Tris, 87,66 g NaCl 800 mL distile suda çözünür. pH, HCl ile 7,4'e ayarlanır. Final hacim 1000 mL olarak distile su ile tamamlandı.

TBS (1 X)

TBS stok solüsyondan (10X) 100 mL alınıp 1 L'ye tamamlandı.

TBST (1X)

TBS stok solüsyondan (10X) 100 mL alınıp 1 L'ye tamamlandı. Bu solüsyona 1 mL Tween-20 eklendi ve iyice karıştırıldı.

% 5' lik Süt Tozu Çözeltisi (Bloklayıcı Çözeltisi)

%5'lik bloklayıcı çözeltisi için 0,5 g yağsız süt tozu tartılarak 10 mL TBS içerisinde çözüldü. Solüsyon 10 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılarak tam çözünmesi sağlandı.

Fosfo-Akt/PKB ve Anti-c-H-Ras Primer Antikorları

Fosfo Akt/PKB ve Bad primer antikor $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Kullanım esnasında TBST ile 1:1000 dilüsyonu hazırlanarak kullanıldı. Anti-c-H-Ras antikor $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Kullanım esnasında TBST ile 1:500 dilüsyon hazırlanarak kullanıldı.

HRP (Horse - Radish Proxydase) konjuge anti-mouse Sekonder Antikoru

Enzim işaretli, mouse kökenli sekonder antikor $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. 1:3000 oranında dilüe edilerek kullanıldı. TBST çözeltisinin 10 mL'sinde 3,5 μL sekonder antikor çözündü.

ECL (Enhanced Chemiluminescence)

ECL-1 ve ECL-2 olmak üzere kit içinde bulunan kromojenik solüsyon 1:1 oranında karıştırıldı. Kit $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

İşlemler

- Membran, temiz ve membranın sığabileceği büyüklükte bir petri kabında TBST ile yıkandı.
- Membranın yüzeyini örtecek şekilde bloklama çözeltisi ilave edilerek 1 saat oda ısısında çalkalayıcı üzerinde hafifçe çalkalandı.
- TBST ile 10 dakika 3 kez yıkandı.
- Primer antikor ile membran yaklaşık tüm gece $+4^{\circ}\text{C}$ 'de hafifçe çalkalayıcı üzerinde çalkalandı.
- Süre sonunda antikor içeren çözelti döküldü ve membran 10 dakika da bir 3 kez TBST ile hafifçe çalkalandı. Böylece zayıf olarak bağlanan ya da bağlanamamış antikorlar membran üzerinden temizlendi.
- Yıkama işlemi bittikten sonra TBST ortamdan uzaklaştırıldı ve enzim işaretli sekonder antikor ile membran 1 saat çalkalandı.
- 1 saat sonunda tekrar TBST ile 10 dakikada bir 3 kez yıkama işlemi yapıldı.
- Yıkama işlemi sonunda membranlar pens yardımı ile yıkama solüsyonu içerisinden alındı ve üzerindeki solüsyonu temiz bir kağıt peçeteye emdirildi.
- Membranlar hızlı bir şekilde temiz ve düzgün bir yüzeye yerleştirildi. Üzerine 1:1 oranında karıştırılan ECL-1 ve ECL-2 tüm yüzeyi kaplayacak şekilde yayıldı.
- Membranlar ECL ile yaklaşık 3 dakika bekletildi.
- Sürenin sonunda membran üzerindeki ECL temiz bir kağıt peçeteye emdirildi ve membranlar streç film üzerine yerleştirildi
- Hızlı bir şekilde membranın üzeri de streç film ile kaplandıktan sonra membran film kasetinin içerisine bantlandı.
- Bu aşamadan sonraki işlemler karanlık odada yapıldı.

3.8.6 Membrandaki Sinyallerin Filme Aktarılması

Kullanılan Solüsyonlar

Hyperfilm

Kemilüminesan sinyallere yüksek afiniteli film kullanıldı.

Developer

Developer 1:10 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

Fiksatif

Fiksatif 1:10 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

İşlemler

- Kasete bantlanan membranın üzerine karanlık odada film konuldu ve 5 dakika beklendi.
- Sürenin sonunda kaset açıldı ve film membranın üzerinden alınıp karanlıkta developer içine konuldu. Filmin üzerinde sinyaller görününceye kadar hafifçe sallandı.
- Daha sonra film developerdan alınıp fiksatife konuldu. Bu aşamadan sonra ışık açılabilir.
- Fiksatiftan çıkan film distile suyla yıkandı ve kuruması için temiz bir yere asıldı.

Filmler protein standartlarına göre değerlendirildi.

3.8.7 Sinyallerin Grafik Haline Dönüştürülmesi

Filme aktarılan sinyaller, bilgisayar ortamında Windows XP işletim sisteminde çalışan İgidoc 1000 programı ile grafik haline dönüştürüldü. Bir bandın yoğunluğu 100 birim kabul edildi ve her grupta diğer bandlar 100 birim üzerinden değerlendirildi.

3.8.8 Membranların İkinci Bir Antikor ile Muamelesi (Stripping)

Elektroforez esnasında kuyucuklara yüklenen lizat içeriğinin protein miktarları, protein standart grafiğinden yararlanılarak eşit miktarlarda aktarıldı. Bununla birlikte, kuyucuklara yüklediğimiz protein miktarının eşit olduğunu gösterebilmek amacıyla, filme aldığımız membranlar, antikor içeriklerinden uzaklaştırılarak (stripping) β -aktin primeri ile muamele edildi. Elde edilen bantların yoğunluğunun eşit olması, kuyulara yüklemiş olduğumuz lizat içeriğindeki protein miktarının eşit olduğunu göstermiştir.

Solüsyonun Hazırlanması (Stripping tamponu)

Hazırladığımız 125 ml tampon içeriğinde; 0,99 g Tris, 12,5 ml SDS (%20), 850 μ l 2-merkaptoetanol karıştırılarak pH 6.8'e ayarlandı ve total hacim miktarına kadar dH₂O ilave edildi.

İşlemler

- Membranlar 30 dak 50° C'de stripping tamponu ile inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından membranlar 3 kez 10 dak TBST ile yıkandı.
- Son olarak 30-60 dak yağsız süt tozu (%5) ile bloklanarak, Western-blot protokolüne devam edildi.

3.9 Primer Vasküler Hücre Kültüründe Apoptozisin Tetiklenmesi ve Ölçüm Metotları

Vasküler düz kas hücre kültürü ortamında, hücrelerimizi apoptozise götürebilmek için Rosner ve arkadaşlarının [96] çalışmalarında yürütmüş oldukları metodu, kendi laboratuvar şartlarımızda manipüle ederek kullandık. Buna göre, 3. kuşak hücreleri takip eden her pasajda hücreler perilere (60 x 15 mm) alınıp, burada uygulamalar için %85-90 oranında yüzeyi kaplamaları beklendi. Akabinde, apoptotik ortam yaratmak amacıyla, öncelikle 24 saat serum-free ortamda bekletildiler. Takip eden günde, medyumları değiştirilmeden (serum-free medyumlu ortam) hücrelere 80 µg IFN-γ ve/veya 1,25 µg Fas-L uygulamasından önce 1 saat içerisinde 100 nM PI3-K inhibitörü wortmanin, 45 dakika 20 µM Akt/PKB inhibitörü SH-5 ve son olarak 30 dakika 10 nM spesifik EGFR blokörü AG490 ile inkübe edildi. Ardından 24 saat daha serum-free de bırakılan hücreler, uygulanacak ölçüm yöntemine göre lizatları hazırlanarak, protein miktarları da hesaplandıktan sonra direkt ölçüme veya gerekirse -70° C’de muhafaza edilerek daha sonra kullanılmak üzere saklandılar.

3.9.1 “Kaspas-3 Hücresel Aktivite Deney Kiti” ne Göre Spektrofotometrik kaspas-3 Tayini

“Calbiochem” firmasına ait kit, hücre ekstraktlarında kaspas-3 ve kaspas-3-benzeri aktiviteleri ölçmek için geliştirilmiştir. 96-kuyucuklu petri formatına uygun ve kaspas aktivitesini ölçmek, hücre ekstraktlarını hazırlamak için gereken tüm reaktifleri içermektedir. Kit içerisinde yer alan kaspas-3 enzimi, bir pozitif kontrol olarak ve endojen inhibitörler için hücre ekstraktlarının test edilmesi amacıyla eklenmiştir. Hücresel kaspas aktivitesine dışarıdan eklenebilecek ajanların etkisi gözlenmek amacıyla kullanılacak olursa, pürifiye enzim, kaspas-3 üzerine bu ajanların direkt etkilerini çek etmek amacıyla hazırda bir anlam katacaktır.

Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması

1. %85-90 oranında yüzeyi dolduran hücreler 1X Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırıldı.
2. 4100 rpm de +4° C’de 10 dakika santrifüj edildi ve her numunedeki hücre sayıları hesaplanarak, 1×10^6 hücre olacak şekilde ayarlandı.
3. Numuneler, 2 kez 1X PBS ile +4° C’de 4100 rpm de çevrilerek, yıkandı. Her seferinde süpernatant atıldı.
4. Her hücre grubunun üzerine kitten temin edilen buz üzerinde soğutulmuş ve %0,1 Triton X-100 eklediğimiz “*hücre lizis tamponu*” dan 200 µL ilave edildi, resüspanse edildi ve buz içerisinde 5 dakika bekletildi.
5. 12500 rpm de +4° C’de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Buradan elde edilen süpernatant ya deney için hemen kullanıldı veya daha sonra deneye alınmak üzere -70° C’de saklandı.

96-kuyucuklu Petri Okuyabilen Spektrofotometrenin Dönüşüm Faktörünün Hesaplanması

Numunelerin aktivitesini pmol substrat/dakika olarak ifade edebilmek adına, spektrofotometre cihazımızın dönüşüm faktörünü hesaplayabilmek için;

- a) İlk kuyucuğa kör olarak kitin içerisinde çıkan deney tamponundan 100 µL (deney hacmi) eklendi.

- b) Dublike çalışabilmek ve bir ortalama elde edebilmek amacıyla takip eden diğer iki kuyucuğa 100 µL standart substratı olan [50 µM *p*-nitroalinin (*p*NA)] ilave edildi.
- c) 405 nm de ölçüm yaparak iki kuyucuktaki ortalama absornbansı hesapladık (Yapılan iki okumadan sırasıyla gözlenen absorbanslar; 0,316 ve 0,325 ve bunların ortalaması 0,321 olarak hesaplandı)
- d) Dönüşüm faktörü hesaplandı. Bu hesap, kalibrasyon standardı içerisindeki *p*-nitroanilin'nin konsatrasyonu (50 µM) baz alınarak hesaplandı. Deney tamponu içerisindeki *p*-nitroanilin için ekstinksiyon katsayısı 10500 M⁻¹cm⁻¹ dir.

Dönüşüm faktörü (µM/A₄₀₅) = 50 µM / ortalama A₄₀₅ (c basamağındaki)

Dönüşüm faktörü = 50 µM / 0,321 = 155,76 µM

- e) Sonuçta pmol/dak cinsinden aktivite aşağıdaki gibi hesaplanmıştır;

Aktivite (pmol/dak) = eğim (ΔA/dak) x dönüşüm faktörü x 100 µL (deney hacmi)

Deney Prosedürü

1. Gerekli tüm kit bileşenleri çözülüp, buz banyosunda muhafaza edildi.
2. 2 mM olarak temin edilen Kaspas-3 Substrat I (Ac-DEVD-pNA), deney tamponu ile 400 µM konsantrasyona seyreltilip, deney esnasında 200 µM olacak şekilde kullanıldı.
3. Deney esnasında 15 µL 2 U/µL olarak kullanılacak 30 U'lık kaspas-3 enzimi, deney tamponu ile 1:5 oranında seyreltildi.
4. Tablo 3.4 de belirtildiği gibi kör ve numunelerin sayısı kadar kuyucuğa deney tamponu ilave edildi.
5. Tablo 3.4 de belirtilen miktarlarda, kuyucuklara hücre lizatları ve kaspas-3 enzimi ilave edildi.
6. 37° C'lik deney ısını sağlayabilmek amacıyla 96-kuyucuklu petri aynı sıcaklıkta 10 dakika etüvde inkübe edildi.
7. 50 µL Kaspas-3 Substrat I ilavesi ile reaksiyon başlatıldı.
8. 405 nm'de absorbans değerleri 5-10 dakikalık aralar ile 30 ve/veya 120 dakikaya kadar okundu.

Tablo 3.4 Deneyde kullanılan çözeltilerin miktarları

	Deney Tamponu	Hücre Ekstraktı	Kaspas-3 2 U/μL	Kaspas-3 Substrat I
<i>Kör</i>	50 μ L	Ø	Ø	50 μ L
<i>Hücre Ekstraktı</i>	40 μ L	10 μ L	Ø	50 μ L
<i>Pürifiye Kaspas-3</i>	35 μ L	Ø	15 μ L	50 μ L
<i>Hücre Ekstraktı/Pürifiye Kaspas-3</i>	25 μ L	10 μ L	15 μ L	50 μ L

3.9.2 Anneksin V-FITC Apoptosis Kiti ile Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi

Anneksin V-FITC Apoptozis belirleme kiti, apoptotik hücreleri flow-sitometre yöntemiyle tespit eder. Anneksinler, kalsiyumun varlığında fosfolipidlere bağlanan homolog proteinlerin bir grubudur [129]. Anneksin V-FITC, kalsiyum varlığında fosfotidilserinlere bağlanan floresan bir proptur. Apoptozisin erken safhaları, fosfolipid asimetrisinin kaybolduğu işlemleri barındıran hücresel değişiklikleri içerir. Yaşayan hücrelerde, fosfotidilserin, Mg-ATP bağımlı enzim olan aminofosfolipid translokaz tarafından lipid bariyerinden içeri taşınır [130]. Apoptotik durumlarda, normal şartlarda plazma membranının iç kısmında bulunan fosfotidilserin membranın dış kısmına translokalle olur. Böylelikle, kalsiyum varlığında fosfotidilserin Anneksin V-FITC ile birleşecek hale gelir.

Prosedür, apoptotik işlemin başlangıcında hücre membranlarında fosfotidilserinin Anneksin V-FITC ile bağlanmasını ve hücre membran ile tamamıyla bütünleşmiş hücresel DNA' nın promidyum iyodite bağlanmasını içerir.

Hücreler Anneksin V-FITC ve promidyum iyodit ile inkübe edilir; oda sıcaklığında 10 dakikalık bir inkübasyonun ardından hücreler flow-sitometresi ile analiz edilir. Anneksin V-FITC yeşil bir floresans ile dedekte edilirken promidyum iyodit kırmızı bir floresans olarak gözlenir.

Deney Prosedürü

1. 1×10^6 hücre/mL sayıda uyarılmamış VDKH süspansiyonu sıfır zamandaki noktayı belirleyebilmek için kontrol olarak hazırlandı.
2. Her iki hücre süspansiyonu da yaklaşık 2 saat boyunca 37 °C, %5 CO₂ de inkübe edildi.
3. Hücreler iki kez PBS ile yıkandı.
4. Yaklaşık 1×10^6 hücre/mL konsantrasyonda olacak hücreler 1X bağlanma tamponu ile resüspanse edildi.
5. Apoptotik hücre süspansiyonundan 500 μ L plastik test tüpüne aktarıldı.
6. Bir ikinci plastik test tüpüne uyarılmamış hücre süspansiyonundan 500 μ L aktarıldı.
7. Her iki hücre süspansiyonuna da 5 μ L anneksin V-FITC ve 10 μ L promidyum iyodit eklendi.
8. Tüpler tam olarak 10 dakika boyunca oda sıcaklığında, karanlıktan korumak şartıyla, inkübe edildi.

9. Hücrelerin floresansı flow-sitometresi ile derhal ölçüldü. Erken apoptotik hücreler sadece anneksin V-FITC ile boyandı. Canlı hücreler, ne promidyum iyodit ne de anneksin V-FITC ile bir boyama göstermiştir. Nekrotik hücreler hem promidyum iyodit hem de anneksin V-FITC ile boyandı.

3.10 FuGENE HD Transfeksiyon Reaktifi ile Transient (Geçici) Ras Plasmid Transfeksiyonu ve Gösterimi

Öncelikli olarak, primer VDKH kültürümüzün hangi oranlarda FuGENE transfeksiyon reaktifine karşılık DNA miktarı gerektirdiğini bulabilmek amacıyla, bir hücre çekirdek boyası olan pCH110 DNA'sından yararlandık [131, 132]. Hücrelerin pCH110 DNA'sı ile transfekte olup olmadıklarının kontrolünü " *β -Galaktozidaz Taşıyıcı Gen Boyama Kiti*" kullanarak gerçekleştirdik [133].

FuGENE HD Geçici Transfeksiyon Reaktif Prosedürü

1. Pasajlanarak 6-kuyucuklu petrilere alınan hücrelerin %70-75 oranında yüzeyi doldurmaları beklendi.
2. Transfeksiyon öncesinde, belirlenen oranlarda serum-free ve PSA içermeyen medyum içerisinde FuGENE ve FuGENE/DNA (pCH110) karışımları (totalde 200 μ L olacak şekilde) ayrıca tablo 3.5 de gösterildiği gibi 30 dakika inkübe edildi.
3. Hücrelerin üzerinden serum içeren medyumları aspire edilerek, 2 mL HBSS ile 2 kez yıkandı.
4. Üzerlerine FBS ve PSA içermeyen medyumdan (sadece L-glutamin ve HEPES içerikli) 800 μ L ilave edildi.
5. İnkübasyon sürelerini tamamlamış FuGENE/DNA karışımları (200 μ L) ilave edilerek total hacimleri 1 mL olacak şekilde 37° C'de CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.
6. Ertesi gün, üzerlerine %1 FBS içeren medyumdan (PSA içermeyen) 1 mL ilave edilerek son 24 saatlik inkübasyonlarına bırakıldılar.
7. Hücrelerin kuyucuklar içerisindeki yoğunlukları mikroskop altında gözlenerek, transfeksiyonun test edilebilmesi açısından β -Galaktozidaz kit prosedürü uygulamasına geçildi.

Tablo 3.5 Kullanılan DNA:FuGENE oranları

ORANLAR DNA:FuGENE	DNA (pCH110)		FuGENE	
	<i>μg DNA</i>	<i>μL Serum-free Medyum</i>	<i>μL FuGENE</i>	<i>μL Serum-free Medyum</i>
1:2	1	99	2	98
2:4	2	98	4	96
3:6	3	97	6	94
4:8	4	96	8	92
3:5	3	97	5	95
4:6	4	96	6	94
5:10	5	95	10	90
6:12	6	94	12	88
5:8	5	95	8	92
6:10	6	94	10	90

β-Galaktozidaz Taşıyıcı Gen Boyama Kiti ile Transfeksiyonun Belirlenmesi

Gen regülasyonunda olduğu kadar mutasyonel olarak değişim gösteren genlerin analizi için, bu taşıyıcı genler “belirteç” olarak geniş bir alanda kullanılmaktadırlar. Eksprese olmuş taşıyıcı genler, doku ve hücrelerde biyokimyasal aktivite deneyleriyle, immünolojik analizlerle veya histokimyasal boyamalar ile tespit edilirler.

β-Galaktozidaz geni, sıklıkla, ökaryotik transfeksiyonlarda taşıyıcı bir gen olarak kullanılır. β-Galaktozidaz, birçok β-galaktozidin hidrolizini katalizler. Substratları, β-galaktozidaz aktivitesini ölçmek için kullanılan kromojenik, floresant ve kemilüminesan maddelerden oluşmuştur. Histolojik boyama için kullanılan X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid) substratı, hücreler içerisinde bir indigo-mavisi rengi oluşturur. Başarılı enzim ekspresyonu bir mikroskop altında rahatça gözlemlenebilir.

Testin prensibi, magnezyum klorid (MgCl₂), potasyum ferrisiyanid [K₃Fe(CN)₆] ve potasyum ferrosiyanid [K₄Fe(CN)₆] içeren PBS çözeltisi içerisinde fikse edilmiş hücre veya dokulara X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid) uygulanmasıdır. Substrat hücrelere girerek β-galaktozidaz tarafından hidrolize edilir. Elde edilen indolil, ferrisiyanid/ferrosiyanid karışımı tarafından katalizlenen bir reaksiyonda indoksile okside olur. İndoksil de bir dimerizasyona uğrayarak indigo-mavisi türevi hücreleri oluşturur.

Prosedür

1. Yukarıda prosedürü ifade edilen transfeksiyon uygulamasının ardından, hücrelerin üzerindeki medyum hızlı bir şekilde buz üzerinde aspire edildi.
2. 1X PBS ile hücreler 2 kez yıkanarak, yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı.
3. Kitin içerisinden çıkan 10X fiksasyon solüsyonu (10X PBS içerisinde %20 formaldehit ve %2 glutaraldehit), 1X PBS ile 1:10 oranında seyreltilerek 1X

şeklilde kuyucuklara 1 ml ilave edildi ve 10 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

4. İnkübasyon esnasında, tablo 3.6 da belirtilen miktarda bir polipropilen tüp içerisinde boyama solüsyonu hazırlandı.
5. 10 dakikalık fiksasyonun ardından, kuyucuklardaki solüsyon buz üzerinde hızlı bir şekilde aspire edildi ve 2 kez 1 mL 1X PBS ile yıkandı.
6. Kuyucuklardan aspire edilen yıkama solüsyonunun ardından, hücrelerin üzerlerine 1 mL hazırlanan boyama solüsyonu ilave edildi.
7. Hücreler bu aşamadan sonra 37° C’de en az 2 saat inkübe edildi.
8. Bu sürenin ardından hücreler mikroskop altında gözlemlenerek β -galaktozidaz eksprese edenler sayılarak yüzdesi hesaplandı.
9. Boyanmış hücrelerin uzun süreli muhafazası için, boyama solüsyonları atılarak, üzerleri %70’lik gliserolle kaplandı ve +4° C’de saklandı.

Tablo 3.6 Boyama solüsyonu karışımı ve miktarları

Bileşik	1 Kuyucuk için gereken miktar
<i>Reaktif A (200 mM MgCl₂)</i>	10 μ L
<i>Reaktif B (400 mM potasyum ferrisiyanid)</i>	10 μ L
<i>Reaktif C (400 mM potasyum ferrosiyanid)</i>	10 μ L
<i>X-Gal çözeltisi [20 mg/ml; dimetilformamid (DMF) içerisinde seyreltilmiş 5-Bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid]</i>	50 μ L
<i>1X PBS</i>	920 μ L
Total hacim	1 mL

Primer VDKH kültürümüz için, bu prosedür sonrasında belirlenen oranda Ras plazmidi ile transfekte edildi ve hücre içi Ras miktar sonuçları Western-blot tekniği ile gösterildi.

BULGULAR

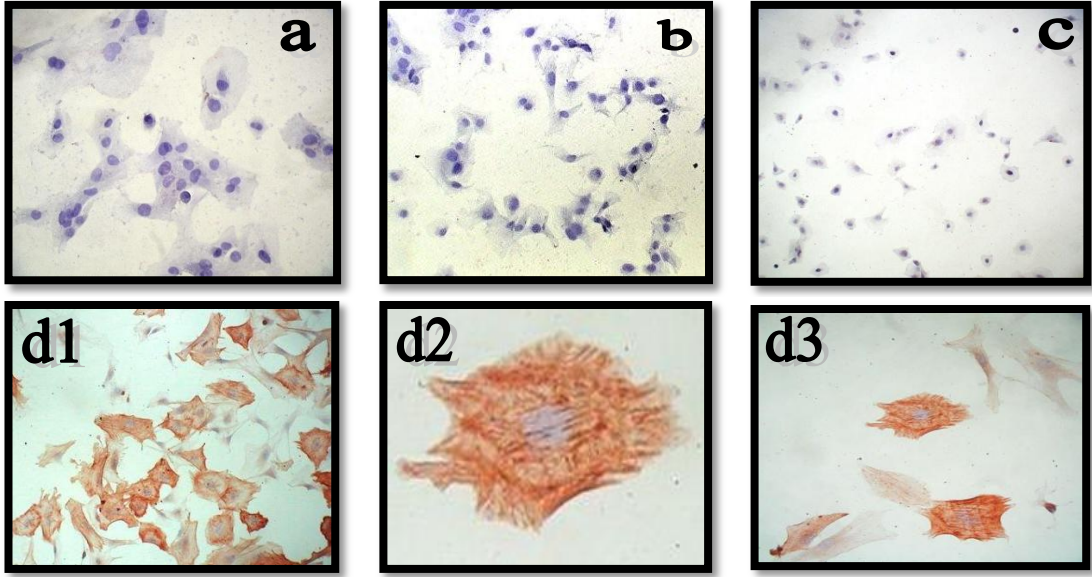
4.1 Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu [127]

İzolasyonu ve primer kültürü yapılan vasküler düz kas hücrelerinin, düz kas hücresi olduğunu gösterebilmek amacı ile immünohistokimya tekniği uygulandı.

Hücre izolasyon işlemi yapıp primer kültüre aktarılan vasküler düz kas hücrelerine 2. kuşakta immünohistokimya tekniği uygulandı. Primer kültüre aktarılan hücreler lamalar üzerinde üretildi ve immünohistokimyasal karakterizasyon için uygun preparatlar haline getirildi.

İmmüno preparatlar 4 gruba ayrılarak çalışıldı.

1. Kontrol Grubu: İmmünohistokimyasal analizlerde kontrol amacıyla kullanıldı. Kontrol gruplarında hiçbir boyamanın olmaması boyamaların primer antikora spesifik olduğunu gösterdi (Şekil 4.1a).
2. İzotip Kontrolü: Boyanmaların sekonder antikordan kaynaklanmadığını göstermek amacıyla kullanıldı. Preparatlarda boyamanın olmaması sekonder antikordan kaynaklanan boyamanın olmadığını, boyanmaların primer antikora spesifik olduğunu gösterdi (Şekil 4.1b).
3. α -Aktin Grubu: Vasküler düz kas hücrelerini gösterebilmek amacıyla düz kas hücrelerinin α -aktin'leri, VDK hücrelerine spesifik α -aktin primer antikoruyla boyandı. Preparattaki kırmızı boyalı alanlar α -aktin'e spesifik düz kas hücrelerini göstermektedir (Şekil 4.1d1 ve 4.1d3). Şekil 4.1d2'de tek bir hücredeki α -aktin fiberleri net olarak görülmektedir. Şekil 4.1d1'de hücrelerin aynı şekilde α -aktin'lerinin boyandıkları görülmektedir. Bu boyamalar izole edip ürettiğimiz hücrelerin düz kas hücresi olduğunu göstermektedir.
4. Von Willebrand Faktör grubu. İzole edilip kültüre aktarılan hücrelerde endotel hücresi bulunup bulunmadığını göstermek amacıyla, Von Willebrand Faktör primer antikoru kullanılarak hücreler boyandı. Preparatlarda kırmızı boyalı alanların olmayışı izole edilen hücrelerde endotel hücresi bulunmadığını göstermektedir (Şekil 4.1c).



Şekil 4.1 Vasküler Düz Kas Hücre Kültürlerinin İmmünohistokimyasal Karakterizasyonu. (a), kontrol gruplarını; (b), izotip kontrolünü; (d1), (d2) ve (d3), vasküler düz kas hücrelerinin α -aktin'lerini; (c), endotel hücrelerinin von willebrand faktör boyamalarını göstermektedir. Boyalı alanlar kırmızı renkli görünmektedir.

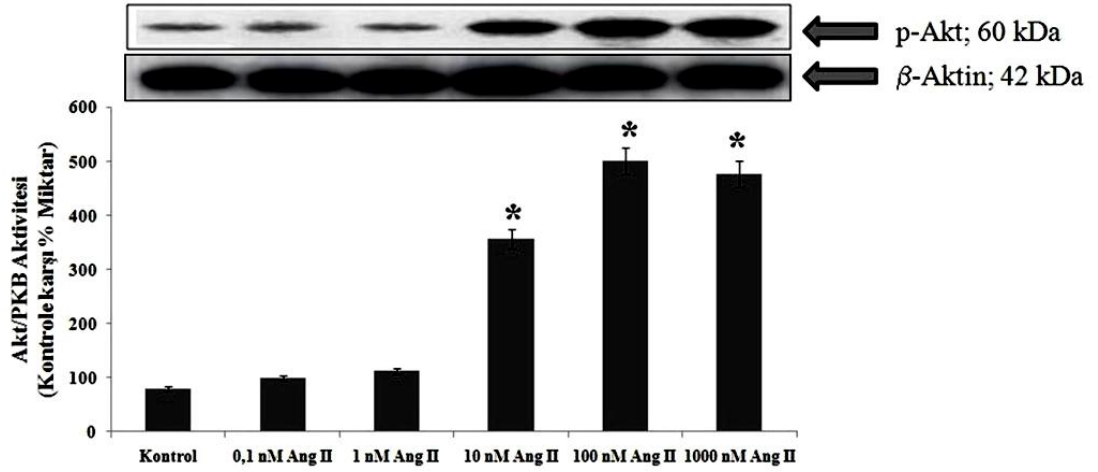
4.2 Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımıyla Akt/PKB Aktivasyonu

Kültürü yapılan vasküler düz kas hücrelerine western blot tekniği uygulanmadan önce hücre canlılığı testleri uygulandı. Üretilen hücrelerin % 99'nun canlı hücreler olduğu tespit edildi. Hücre cevaplarının standardize etmek açısından üretilen hücrelerin 3-8 pasajları deney aşamasına alındı. Deneylerde Akt/PKB aktivasyonunu veya inhibisyonunu göstermek amacıyla yapılan western blot sonuçları 3 tekrar olarak çalışıldı.

4.2.1 VDK Hücrelerinde Ang II Etkisiyle Akt/PKB Doz Bağımlı Fosforilasyonu

Ang II'nin, vasküler düz kas hücre kültürlerinde mitojen aktive edici kinazları aktive eden en iyi konsantrasyonunu bulabilmek amacıyla hücre kültürleri 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM ve 1000 nM farklı Ang II konsantrasyonları ile 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre lizatları hazırlandı ve western blot tekniği uygulanarak Akt/PKB aktivasyonları incelendi. Western blot sonuçlarına göre kontrol gruplarına göre 100 nM'a kadar konsantrasyon artışıyla birlikte fosforilasyon artışı saptandı. 10, 100 ve 1000 nM konsantrasyonlardaki fosforilasyon artışları birbirine yakındı. Ancak Akt/PKB'yi en iyi aktive eden değer 100 nM olarak bulundu (Şekil 4.2). Bu sonuçlar Ang II'nin, VDK hücrelerini doz bağımlı olarak aktive ettiğini göstermektedir.

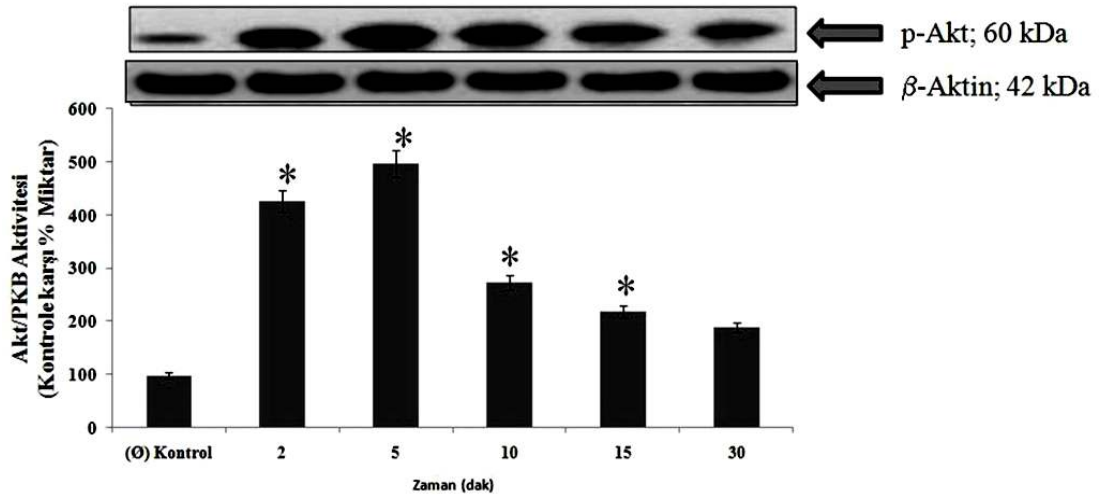
Elde edilen western blot sonuçlarının daha iyi anlaşılabilir olması için veriler grafiğe aktarıldı (Şekil 4.2). Western blot üzerindeki bantların bir tanesinin yoğunluğu 100 birim kabul edildi ve diğer bantların yoğunluğu 100 birim üzerinden değerlendirildi.



Şekil 4.2 VDKH'lerinde Ang II'nin farklı konsantrasyonlarının Akt/PKB üzerine etkisi. VDKH kültürleri Ang II'nin yukarıda gösterilen farklı konsantrasyonlarında inkübe edildi ve Akt/PKB aktivasyonları incelendi. Akt/PKB'i en iyi aktive eden Ang II konsantrasyonunun 100 nM olduğu saptandı. (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir. * Kontrolle karşı $P < 0,05$)

4.2.2 VDK Hücrelerinde Ang II Etkisiyle Akt/PKB Süre Bağımlı Fosforilasyonu

Ang II'nin VDKH kültürlerinde Akt/PKB 100 nM konsantrasyonda maksimum aktive ettiği belirlendikten sonra bu konsantrasyonda hücre kültürleri 2, 5, 10, 15 ve 30 dakika olmak üzere farklı sürelerde aktive edildi. Hücrelerin Ang II ile farklı sürelerde inkübe edilmesinin sebebi Ang II'nin Akt/PKB aktivasyon süresini belirlemektir. Aktivasyon sonunda hücre lizatları hazırlandı ve western blot tekniği uygulanarak Akt/PKB aktivasyonları incelendi (Şekil 4.3). Kontrol grubunda bazal seviyede aktivasyon olurken 2. dakikada aktivasyon artışı saptandı. 5. dakikada aktivasyon maksimum seviyeye çıktıktan sonra 30. dakikaya kadar bir düşüş görüldü. Western blot sonuçları 100 nM Ang II'nin Akt/PKB 5. dakika maksimum aktive ettiğini gösterdi (Şekil 4.3).



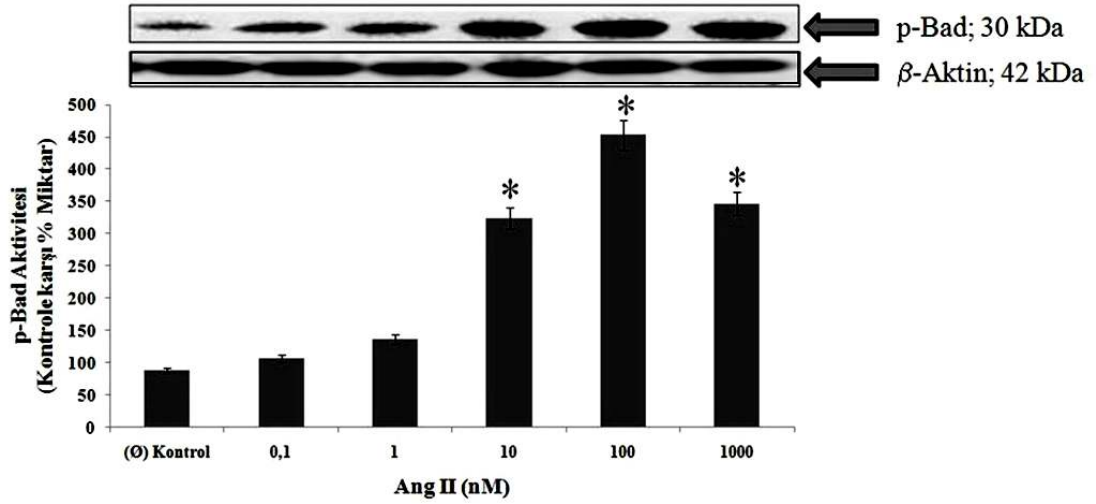
Şekil 4.3 VDKH kültürlerinde Ang II'nin Akt/PKB üzerine farklı sürelerde aktivasyonları. Hücreler 100 nM Ang II ile yukarıdaki sürelerde inkübe edildi ve Akt/PKB fosforilasyonları incelendi. VDKH kültürlerinde 100 nM Ang II'nin 5. dakikada Akt/PKB'i maksimum fosforilleştiği gözlemlendi. (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir. * Kontrolle karşı $P < 0,05$).

4.3 Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımıyla Bad Aktivasyonu

Kültürü yapılan vasküler düz kas hücrelerine western blot tekniği uygulanmadan önce hücre canlılığı testleri uygulandı. Üretilen hücrelerin % 99'nun canlı hücreler olduğu tespit edildi. Hücre cevaplarının standardize etmek açısından üretilen hücrelerin 3-8 pasajları deney aşamasına alındı. Deneylerde Bad aktivasyonunu göstermek amacıyla yapılan western blot sonuçları 3 tekrar olarak çalışıldı.

4.3.1 VDK Hücrelerinde Ang II Etkisiyle Bad Doz Bağımlı Fosforilasyonu

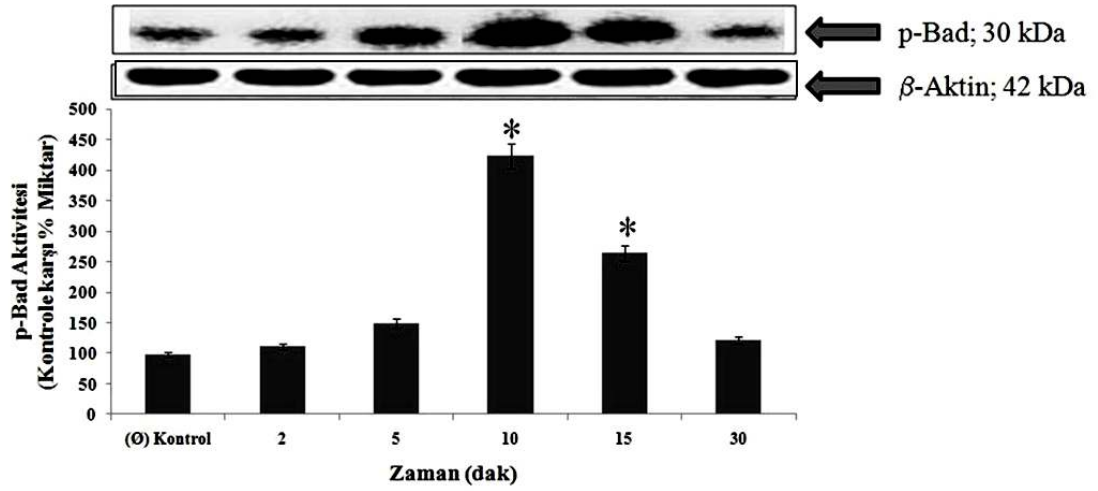
Ang II'nin, vasküler düz kas hücre kültürlerinde Bad proteinini aktive eden en iyi konsantrasyonunu bulabilmek amacıyla hücre kültürleri 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM ve 1000 nM farklı Ang II konsantrasyonları ile 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre lizatları hazırlandı ve western blot tekniği uygulanarak Bad aktivasyonları incelendi. Western blot sonuçlarına göre kontrol gruplarına göre 100 nM'a kadar konsantrasyon artışıyla birlikte fosforilasyon artışı saptandı. Bad'ı en iyi aktive eden değer 100 nM olarak bulundu (Şekil 4.4). Bu sonuçlar Ang II'nin, VDK hücrelerinde doz bağımlı olarak Bad'ı aktive ettiğini göstermektedir.



Şekil 4.4 VDKH'lerinde Ang II konsantrasyonunun Bad aktivasyonu üzerine etkisi. VDKH kültürleri Ang II'nin yukarıda gösterilen farklı konsantrasyonlarında inkübe edildi ve Bad aktivasyonları incelendi. Bad'ı en iyi aktive eden Ang II konsantrasyonunun 100 nM olduğu saptandı (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir. * Kontrolle karşı $P < 0,05$).

4.3.2 VDK Hücrelerinde Ang II Etkisiyle Bad Süre Bağımlı Fosforilasyonu

Ang II'nin VDKH kültürlerinde Bad 100 nM konsantrasyonda maksimum aktive ettiği belirlendikten sonra bu konsantrasyonda hücre kültürleri 2, 5, 10, 15 ve 30 dakika olmak üzere farklı sürelerde aktive edildi. Hücrelerin Ang II ile farklı sürelerde inkübe edilmesinin sebebi Ang II'nin Bad aktivasyon süresini belirlemektir. Aktivasyon sonunda hücre lizatları hazırladı ve western blot tekniği uygulanarak Bad aktivasyonları incelendi (Şekil 4.5). Kontrol grubunda bazal seviyede aktivasyon olurken 2. dakikada aktivasyon artışı saptandı. Bu dakikadaki aktivasyonun maksimum seviyede olduğu ardından 30. dakikaya kadar bir düşüş saptandı. Western blot sonuçları 100 nM Ang II'nin Bad'ı 10 dakika içerisinde maksimum düzeyde aktive ettiğini gösterdi (Şekil 4.5).



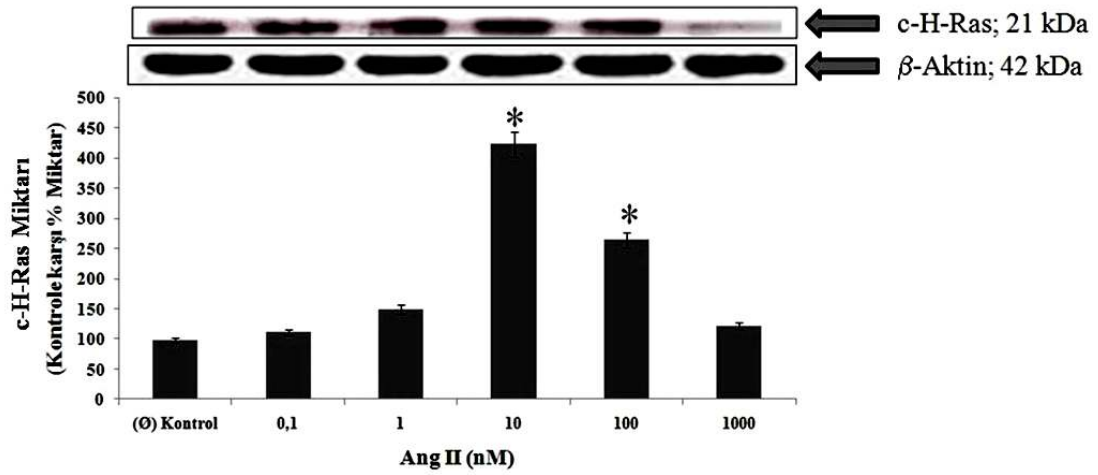
Şekil 4.5 VDKH kültürlerinde Ang II etkisiyle Bad üzerine farklı sürelerde aktivasyonları. Hücreler 100 nM Ang II ile yukarıdaki sürelerde inkübe edildi ve Bad fosforilasyonları incelendi. VDKH kültürlerinde 100 nM Ang II'nin 10 dakikada Bad'ı maksimum fosforilleştiği gözlemlendi (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir. * Kontrolle karşı $P < 0,05$).

4.3.3 Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımıyla Ras Miktarının Tayini

Kültürü yapılan vasküler düz kas hücrelerine western blot tekniği uygulanmadan önce hücre canlılığı testleri uygulandı. Üretilen hücrelerin % 99'nun canlı hücreler olduğu tespit edildi. Hücre cevaplarının standardize etmek açısından üretilen hücrelerin 3-8 pasajları deney aşamasına alındı. Deneylerde hücre içi Ras miktarını göstermek amacıyla yapılan western blot sonuçları 3 tekrar olarak çalışıldı.

4.3.4 VDK Hücrelerinde Ang II Etkisiyle Ras Doz Bağımlı Miktarının Belirlenmesi

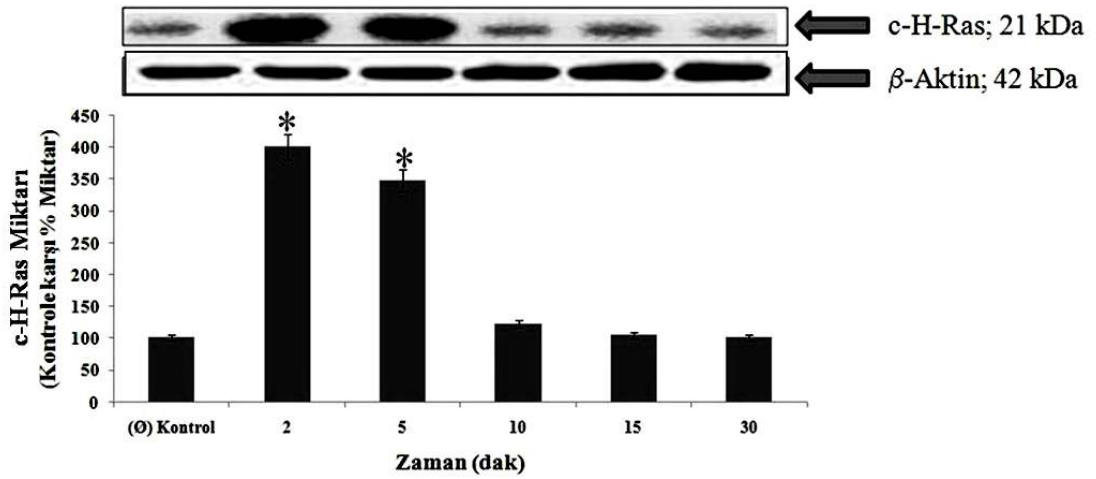
Ang II'nin, vasküler düz kas hücre kültürlerinde Ras miktarını arttıran en iyi konsantrasyonunu bulabilmek amacıyla hücre kültürleri 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM ve 1000 nM farklı Ang II konsantrasyonları ile 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre lizatları hazırlandı ve western blot tekniği uygulanarak Ras miktarları incelendi. Western blot sonuçlarına göre kontrol gruplarına göre 100 nM'a kadar konsantrasyon artışıyla birlikte miktarın artışı saptandı. 10 ve 100 nM konsantrasyonlardaki yoğunluk artışları birbirine yakındı. Ancak Ras'ın miktarını en fazla arttıran değer 10 nM olarak bulundu (Şekil 4.6). Bu sonuçlar Ang II uyarımıyla, VDK hücrelerinde doz bağımlı olarak Ras miktarını arttırdığını göstermektedir.



Şekil 4.6 VDKH'lerinde Ang II konsantrasyonunun Ras miktarı üzerine etkisi. VDKH kültürleri Ang II'nin yukarıda gösterilen farklı konsantrasyonlarında inkübe edildi ve Ras aktivasyonları incelendi. Ras'ı miktarının en fazla arttığı Ang II konsantrasyonun 10 nM olduğu saptandı (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir. * kontrole karşı $P < 0,05$).

4.3.5 VDK Hücrelerinde Ang II Etkisiyle Ras Süre Bağımlı Miktar Tayini

Ang II'nin VDKH kültürlerinde Ras 10 nM konsantrasyonda maksimum aktive ettiği belirlendikten sonra bu konsantrasyonda hücre kültürleri 2, 5, 10, 15 ve 30 dakika olmak üzere farklı sürelerde aktive edildi. Hücrelerin Ang II ile farklı sürelerde inkübe edilmesinin sebebi Ang II'nin Ras aktivasyon süresini belirlemektir. Aktivasyon sonunda hücre lizatları hazırlandı ve western blot tekniği uygulanarak Ras yoğunlukları incelendi (Şekil 4.7). Kontrol grubunda bazal seviyede kalırken 2. dakikada miktar artışı saptandı. Bu dakikadaki miktar artışının maksimum seviyede olduğu ardından 30. dakikaya kadar bir düşüş saptandı. Western blot sonuçları 10 nM konsantrasyondaki Ang II'nin etkisiyle Ras 2 dakika içerisinde maksimum düzeyde miktar artışı gösterdi (Şekil 4.7).



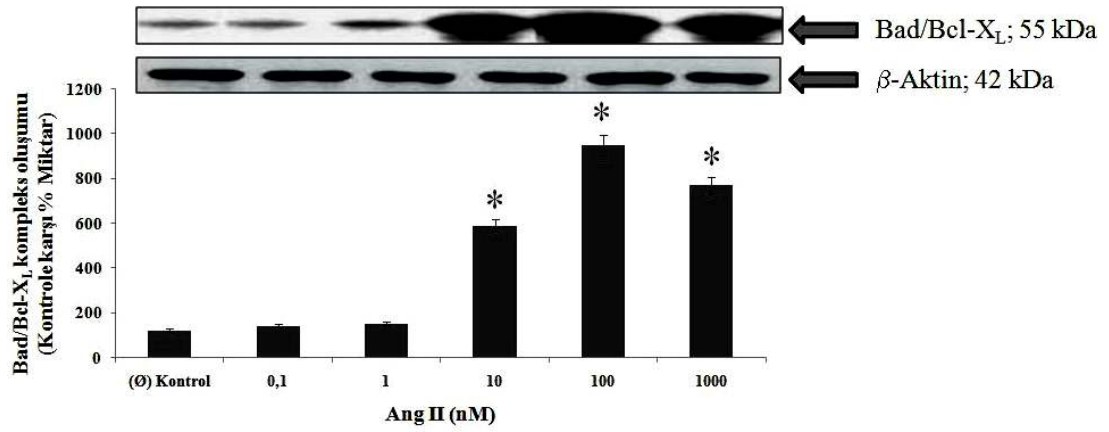
Şekil 4.7 VDKH kültürlerinde Ang II'nin Ras miktarı üzerine farklı sürelerde etkisi. Hücreler 10 nM Ang II ile yukarıdaki sürelerde inkübe edildi ve hücre içi Ras miktarları incelendi. VDKH kültürlerinde 10 nM konsantrasyonundaki Ang II'nin 2 dakikada Ras miktarını maksimum seviyeye çıkardığı gözlemlendi. (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir. * Kontrolle karşı $P < 0,05$).

4.4 Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Ang II Uyarımıyla Bad/Bcl-X_L Kompleks Oluşumu

Kültürü yapılan vasküler düz kas hücrelerine western blot tekniği uygulanmadan önce hücre canlılığı testleri uygulandı. Üretilen hücrelerin % 99'nun canlı hücreler olduğu tespit edildi. Hücre cevaplarının standardize etmek açısından üretilen hücrelerin 3-8 pasajları deney aşamasına alındı. Deneylerde Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumunu göstermek amacıyla önce lizatlar materyal metod'da anlatıldığı gibi Bcl-X_L ile immünpresipite edildi ardından p-Bad ile yapılan western blot sonuçları 3 tekrar olarak çalışıldı.

4.4.1 VDK Hücrelerinde Ang II Etkisiyle Bad/Bcl-X_L Doz Bağımlı Kompleks Oluşumu

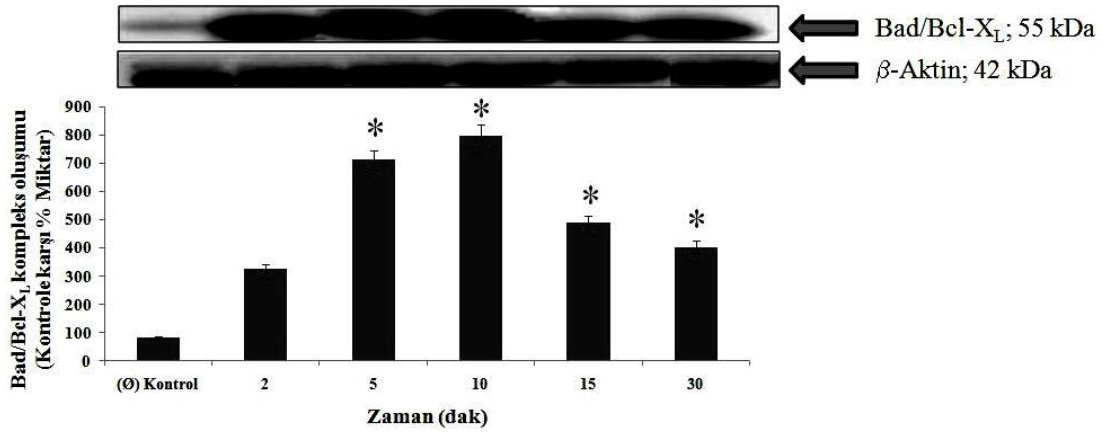
Ang II'nin, vasküler düz kas hücre kültürlerinde Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumunu aktive eden en iyi konsantrasyonu bulabilmek amacıyla hücre kültürleri 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM ve 1000 nM farklı Ang II konsantrasyonları ile 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre lizatları hazırlandı ve western blot tekniği uygulanarak Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu incelendi. Western blot sonuçlarına göre kontrol gruplarına göre 100 nM'a kadar konsantrasyon artışıyla birlikte fosforilasyon artışı saptandı. 10 ve 100 nM konsantrasyonlardaki kompleks oluşumları birbirine yakındı. Ancak Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumunu en iyi aktive eden değer 100 nM olarak bulundu (Şekil 4.8). Bu sonuçlar Ang II'nin, VDK hücrelerini doz bağımlı olarak aktive ettiğini göstermektedir.



Şekil 4.8 VDKH'lerinde Ang II konsantrasyonunun Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu üzerine etkisi. VDKH kültürleri Ang II'nin yukarıda gösterilen farklı konsantrasyonlarında inkübe edildi ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumları incelendi. Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumunu en iyi aktive eden Ang II konsantrasyonunun 100 nM olduğu saptandı. (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir. * Kontrolle karşı P<0,05).

4.4.2 VDK Hücrelerinde Ang II Etkisiyle Bad/Bcl-X_L Süre Bağımlı Kompleks Oluşumu

Ang II'nin VDKH kültürlerinde Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumunu 100 nM konsantrasyonda maksimum aktive ettiği belirlendikten sonra bu konsantrasyonda hücre kültürleri 2, 5, 10, 15 ve 30 dakika olmak üzere farklı sürelerde aktive edildi. Hücrelerin Ang II ile farklı sürelerde inkübe edilmesinin sebebi Ang II'nin Bad/Bcl-X_L kompleks oluşum süresini belirlemektir. Aktivasyon sonunda hücre lizatları hazırlandı ve western blot tekniği uygulanarak Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu incelendi (Şekil 4.9). Kontrol grubuna göre 2. dakikada aktivasyon artışı saptandı. Bu dakikadan sonra aktivasyonun maksimum seviyede olduğu dakikanın 15 olduğu ardından 30. dakikada düşüş saptandı. Western blot sonuçları 100 nM Ang II'nin Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumunu 15 dakika içerisinde maksimum düzeyde aktive ettiğini gösterdi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 VDKH kültürlerinde Ang II'nin Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu üzerine farklı sürelerde aktivasyonları. Hücreler 100 nM Ang II ile yukarıdaki sürelerde inkübe edildi ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu incelendi. VDKH kültürlerinde 100 nM Ang II'nin 15 dakikada Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumunu tetiklediği gözlemlendi (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir. * Kontrolle karşı P<0,05).

4.5 VDK Hücrelerinde Ang II'nin AT1 Reseptörü Üzerinden Akt/PKB Fosforilasyonu

Ang II'nin, VDKH kültürlerinde Akt/PKB'i AT1 reseptörü üzerinden aktive ettiği literatürde gösterilmiştir [50]. Daha önceden yapılan çalışmalarda VDK hücrelerinde AT1 reseptör antagonisti losartan ile 10^{-5} M konsantrasyonda 1 saat muamele edildiğinde, AT1 reseptörünün baskılandığı gösterilmiştir [134].

Bu çalışmada da Ang II'nin Akt/PKB'i fosforile eden sinyallerinin AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştiği gösterildi (Şekil 4.10).

İlk bant, hiçbir uyarıma maruz kalmamış, direkt olarak lizatları hazırlanmış kontrol hücre grubuna ait aktivasyonu göstermektedir.

İkinci bant, 100 nM 10 dakika Ang II uyarımının ardından elde edilen lizat grubundaki hücrelerin verdiği Akt/PKB aktivasyon cevabını göstermektedir.

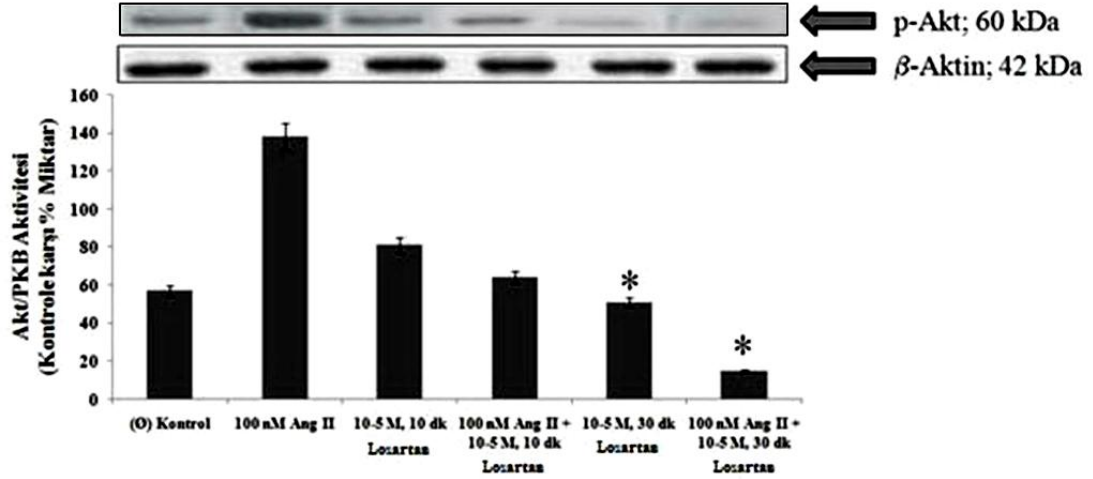
Üçüncü bantta, yalnız 10 dakika 10^{-5} M losartan uygulanmış hücre grubunun vermiş olduğu cevap gözlenmektedir ki, bir miktar inhibisyon olsa da istatistiksel olarak bazal, kontrol seviyesinin altına düşmemiş olması, inhibisyonun gözlenmesinde Ang II uyarımının gerekliliğini göstermektedir.

Dördüncü bant, 10 dakika 10^{-5} M losartan ve 100 nM 10 dk. Ang II uyarımının ardından elde edilen hücre lizatlarında bazal seviyeye kadar bir düşüşün gözlemlendiği Akt/PKB bandını ifade etmektedir.

Beşinci bant, 10^{-5} M losartanın 30 dakika boyunca hücrelerle inkübasyonu sonunda lizat haline getirilmiş hücrelerden elde edilen Akt/PKB aktivasyon sonucunu göstermektedir ki, bu da tek başına 10 dakikalık aplikasyon sonucundan daha belirgin olarak bir inhibisyon gerçekleştirmiştir.

En son altıncı bant, 30 dakika 10^{-5} M losartan uygulamasının ardından 100 nM 10 dakikalık Ang II uyarımıyla elde edilen hücre lizatlarındaki Akt/PKB aktivasyonunu göstermektedir. Bu noktada inhibisyonun tamamen gerçekleştiği ve Akt/PKB aktivasyonunun gözlenmediği banttır.

Sonuç olarak Akt/PKB aktivasyonunu, Ang II uyarımınca AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştirmektedir. Ayrıca 10^{-5} M losartanın 30 dakikalık inkübasyonunun hücreler üzerinde Akt/PKB aktivasyonunun baskılanmasında yeterli olacağı saptanmıştır.



Şekil 4.10 VDKH'lerinde AT1 reseptörünün Akt/PKB üzerindeki rolü. Kontrol bandı hiçbir uyarıya maruz kalmamış hücre grubunu temsil etmektedir. İkinci bant 100 nM Ang II ile 10 dakika inkübe edilmiş hücre grubunda Akt/PKB aktivasyonunu göstermektedir. Üçüncü bant, 10 dakika 10^{-5} M losartan uygulaması ardından Akt/PKB aktivasyonunu işaret etmektedir. Dördüncü bant, 10^{-5} M losartan ile 10 dakika inkübe edildikten sonra 10 dakika 100 nM Ang II uyarımına maruz bırakılmış hücrelerde Akt/PKB aktivasyonunu göstermektedir. Beşinci bant, yalnız 10^{-5} M losartan ile 30 dakika inkübasyonun ardından gözlemlenen Akt aktivasyonunu belirtirken, en sonuncu ve altıncı bant 30 dakika 10^{-5} M losartan ve 10 dakika 100 nM Ang II uyarımını takiben gözlemlenen Akt/PKB fosforilasyonunu göstermektedir (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir). * Kontrolle karşı $P < 0,05$).

4.6 VDK Hücrelerinde Ang II Akt/PKB Uyarımını PI3-K Üzerinden Gerçekleştirmektedir

Ang II'nin, VDKH kültürlerinde Akt/PKB'yi PI3-K üzerinden aktive ettiği literatürde gösterilmiştir [50]. Daha önceden yapılan çalışmalarda VDK hücrelerinde PI3-K spesifik inhibitörü wortmanın ile 100 nM konsantrasyonda 1 saat muamele edildiğinde, Akt/PKB'yi baskılandığı gösterilmiştir [135].

Bu çalışmada da Ang II'nin Akt/PKB'yi fosforile eden sinyallerinin PI3-K üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir (Şekil 4.11).

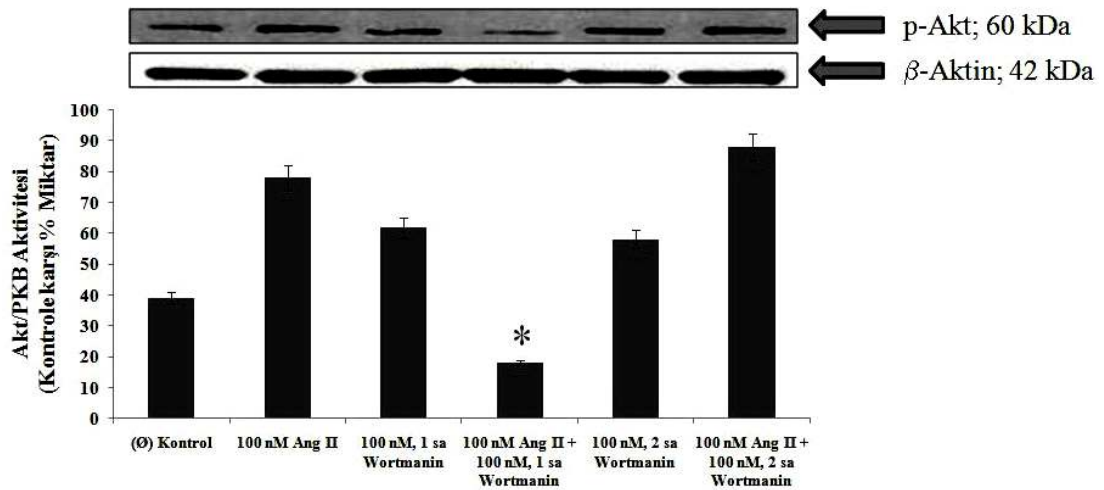
İlk bant, hiçbir uyarıya tabi tutulmamış kontrol hücrelerimizdeki Akt/PKB aktivasyonunu göstermektedir. Bunu takip eden ikinci ve üçüncü bantlarda, sırasıyla tek başına 10 dakika 100 nM Ang II ve 1 saat 100 nM wortmanın uygulamalarının

ardından elde edilen hücre lizatlarındaki Akt/PKB fosforilasyonları gösterilmektedir. Tek başına wortmanin inhibitörünün kullanıldığı üçüncü bant gözlenen aktivasyonu bazal seviyeye çekememiştir.

Dördüncü bantta, 1 saat 100 nM wortmanine maruz bırakılan hücreler 10 dakika 100 nM Ang II ile uyarıldıktan sonra lizat haline getirilmiş ve gözlenen bazal seviyenin de altında bir inhibisyonla Akt/PKB fosforilasyonu olmuştur.

Bu bandı takiben gelen diğer iki bant, sırasıyla tek başına 2 saat 100 nM wortmanin ve son bantta 2 saat 100 nM wortmanin inkübasyonunu takiben 10 dakika 100 nM Ang II uyarımına maruz bırakılmış hücre lizatlarındaki Akt/PKB aktivasyonları gözlenmektedir. Bu noktada baskılanmanın bazal seviyenin de üstünde olduğu ve inhibisyonun gerçekleşmediği görülmektedir.

Sonuç olarak 1 saat 100 nM wortmanin, 100 nM 10 dakikalık Ang II uyarımının ardından Akt/PKB blokasyonu için yeterli olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.11 VDKH'lerinde Akt/PKB uyarımı PI3-K üzerinden gerçekleşmektedir. İlk bantta uyarılmamış kontrol hücre grubuna ait Akt/PKB fosforilasyonu görülmektedir. Takip eden ikinci ve üçüncü bantlarda tek başına Ang II (100 nM; 10 dk) ve wortmanin (100 nM; 1 sa) uyarımlarını takiben Akt/PKB aktivasyonları gösterilmektedir. Dördüncü bant Ang II (100 nM; 10 dk) ve wortmanin (100 nM; 1 sa) beraber kullanılarak Akt/PKB fosforilasyonuna bakıldığı grup hücreyi simgelemektedir. Beşinci ve altıncı bantlarda, sırasıyla tek başına wortmanin (100 nM; 2 sa) ve Ang II (100 nM; 10 dk) ile wortmanin (100 nM; 2 sa) beraber kullanıldığı hücre gruplarını işaret etmektedir (Şekil yapılan 3 deneyden bir tanesini göstermektedir. * Kontrol karşı $P<0,05$).

4.7 Ang II Uyarımında Fosforile Proteinler Akt/PKB ve Bad, H-Ras Miktarı ve Bad/Bcl-X_L Kompleks Oluşumu Üzerine, PKC İnhibitörü GF109203X, Src İnhibitörü PP2 Ras İnhibitörü FPTIII ve Spesifik EGF ve PDGF Reseptör Blokörleri Olan AG1478 ve AG1295'in Etkileri

Deney ortamına alınan primer VDKH'leri %80-90 oranında 6-kuyucuklu petrilere doldurduklarında 24 saat boyunca serum-free medyumlu ortama bırakıldılar. Takip eden günde, hücrelere 10 dakika 100 nM Ang II uygulamasından önce, 2 μ M 5 dakika PKC inhibitörü GF109203X, 30 dakika 10000 nM spesifik Src inhibitörü PP2, 18 saat 10 μ M Ras inhibitörü FPT III ve Spesifik EGF ve PDGF reseptör blokörleri olan AG1478 ve AG1295 (sırasıyla, 1 μ M 30 dakika; 10 μ M 24 saat), uygulaması yapılarak inkübe edildiler. Ardından, daha önceden belirtilen prosedüre [127] göre lizatları hazırlanarak Western-blot tekniği ile Akt/PKB ve Bad fosforilasyonlarına, H-Ras varlığına ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu üzerine etkileri gözlemlendi (Şekil 4.12).

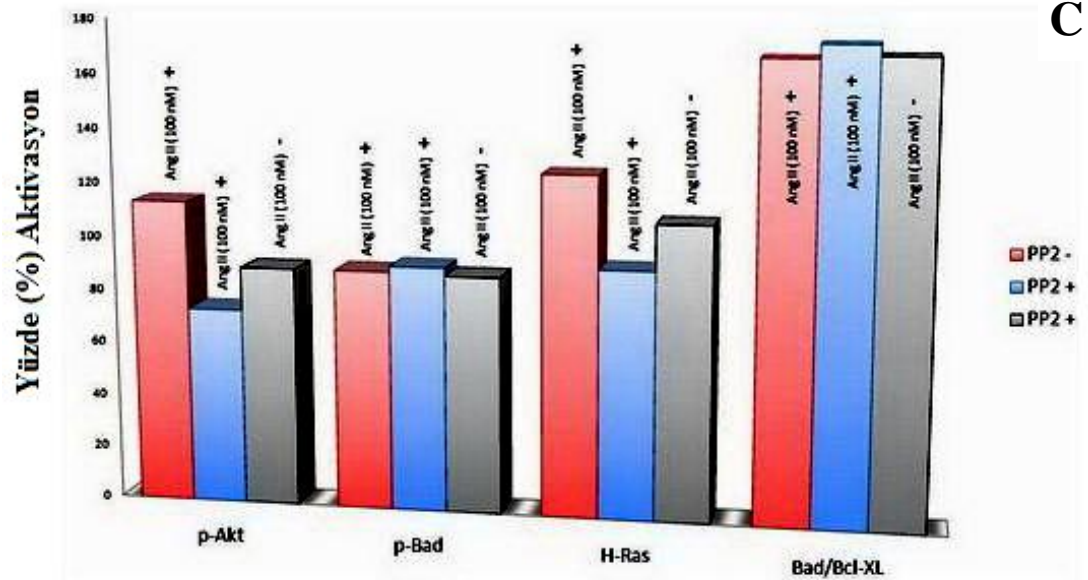
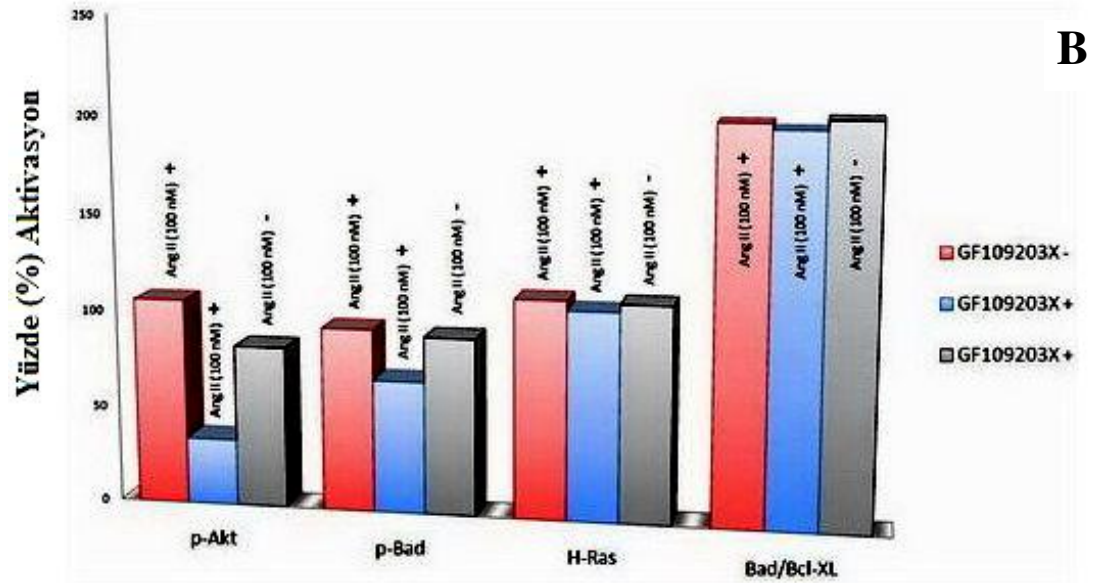
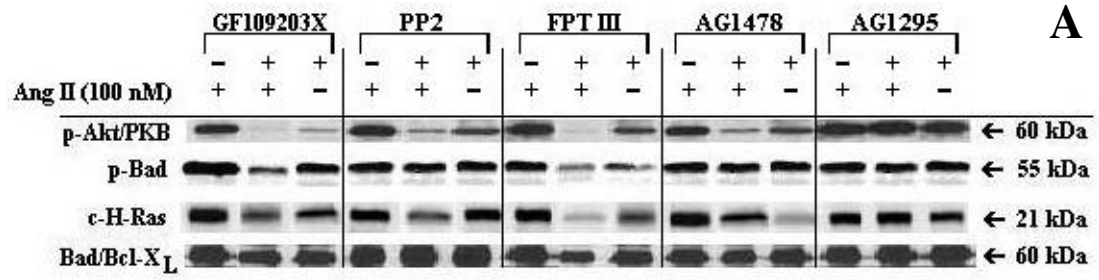
GF109203X'in 5 dakika 2 μ M'lık uygulamasını takiben 100 nM Ang II ile uyarılmış hücrelerde belirgin olarak p-Akt aktivasyonunda bir inhibisyon tespit edildi. İlerleyen dakikalarda bu inhibisyonun ortadan kalktığı gözlemlendi (verileri burada gösterilmemiştir). Yalnız GF109203X ile uyarılmış hücrelerde de kontrole göre ilk 5 dakikada bir düşüşün olduğu görülmektedir. İstatistiksel olarak bir başka düşüşte GF109203X inhibisyonunu takiben Ang II ile uyarılan hücrelerde gözlenen Bad proteininin fosforilasyonunda olmuştur.

Spesifik Src inhibitörü PP2'nin 30 dakika 10000 nM'lık uygulamasını takiben 100 nM Ang II ile uyarılan hücrelerde, istatistiksel olarak pek anlamlı olmasa da sadece Akt fosforilasyonunda bir düşüş gözlenmiştir.

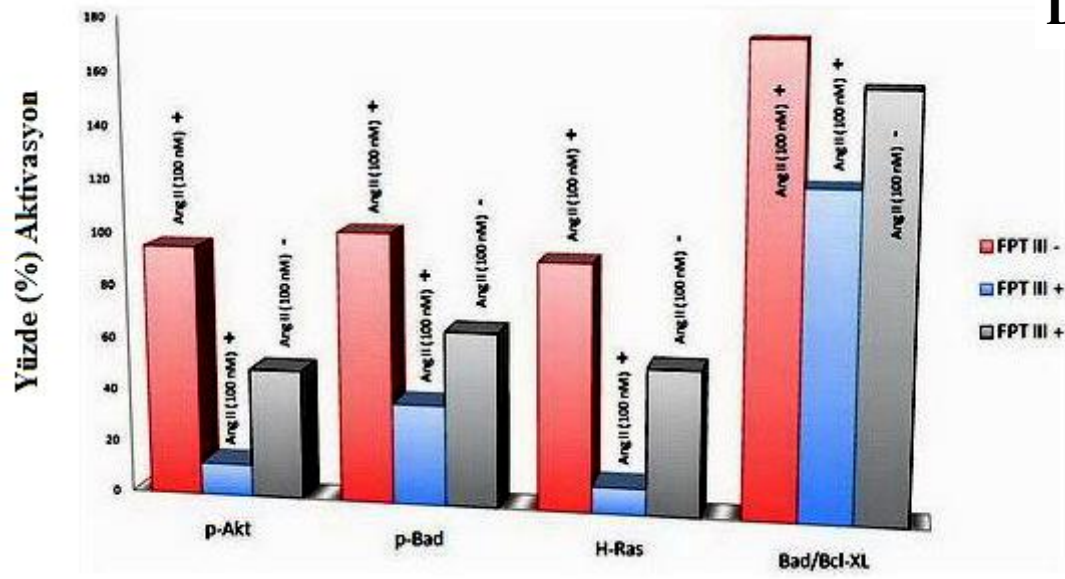
Ras inhibitörü FPT III'ün 10 μ M 18 saatlik inkübasyonu, hücrelerin 24 saat boyunca serum-free ortama terk edilmesinden 6 saat sonra başlatılmıştır. Bu zaman sonunda 10 dakika 100 nM Ang II ile uyarılan hücrelerde, Akt ve Bad fosforilasyonunda, H-Ras miktarında ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumunda, istatistiksel olarak da belirgin bir düşüş gözlenmiştir.

EGF-R blokörü olan AG1478, 100 nM 10 dakika Ang II uygulamasından önce 1 μ M ve 30 dakika boyunca hücrelerle inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda yalnız Akt fosforilasyonunda anlamlı bir düşüş saptanmıştır.

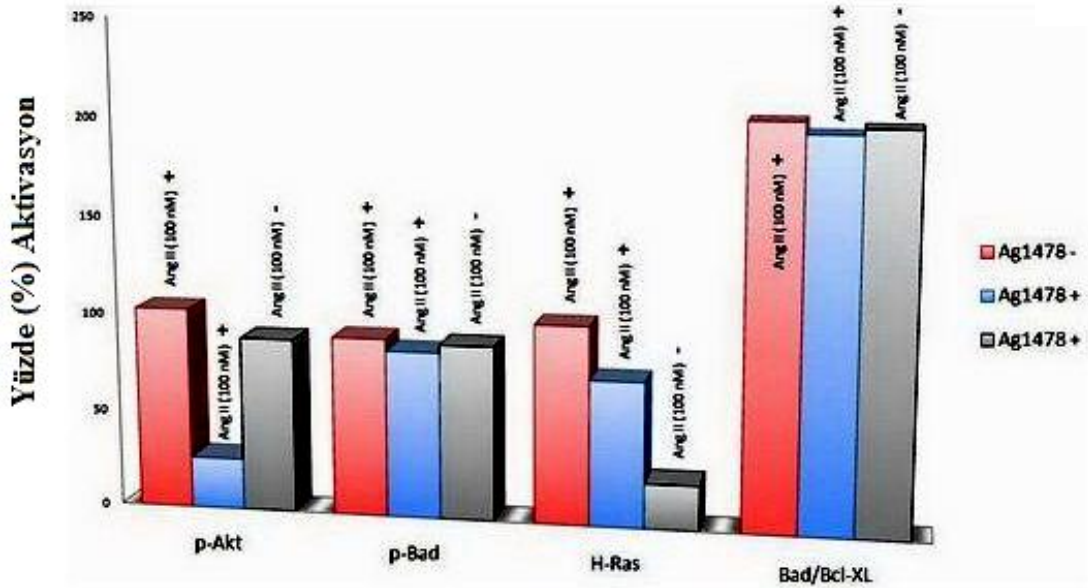
Hücrelerin 24 saat serum-free ortamda bırakılmalarıyla aynı anda başlatılan 10 μ M'lık spesifik PDGF-R blokörü AG1295 uygulamasının ardından, 10 dakika 100 nM Ang II uyarımına maruz kalan hücrelerde herhangi kayda değer bir inhibisyon gözlenmemiştir.

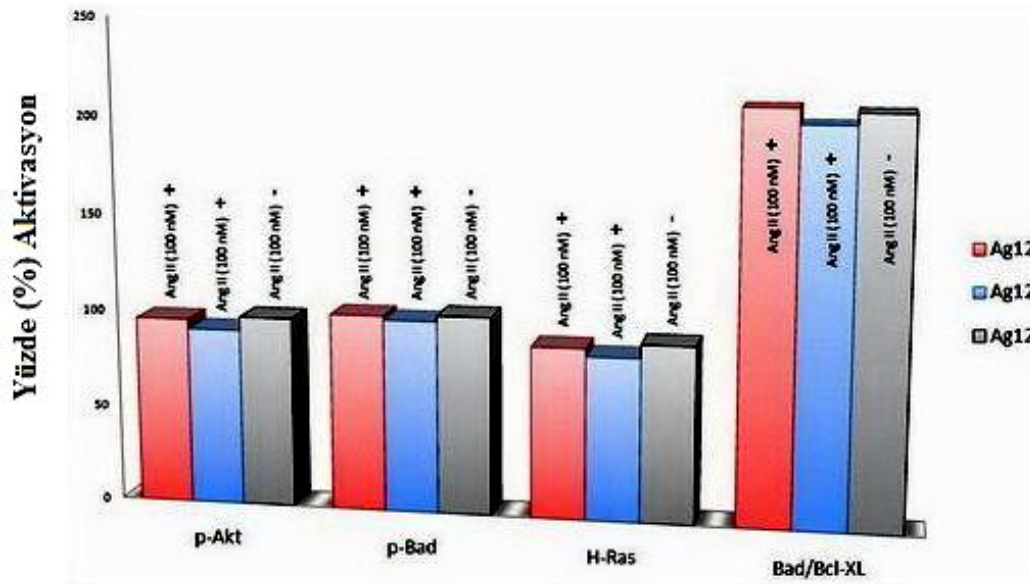


D



E





Şekil 4.12 Ang II ile uyarılan VDKH'lerinde GF109203X, PP2, FPT III, AG1478 ve AG1295 uygulamalarının Akt/PKB, Bad, Ras miktarı ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu üzerine etkileri. 2µM PKC inhibitörü GF109203X'in 5 dakikalık VDKH kültüründeki inkübasyonunu ardında ortama 10 dakika boyunca 100 nM Ang II uygulanmasıyla birlikte Akt/PKB ve Bad proteinlerinin fosforilasyonlarında belirgin bir düşüş tespit edilmiştir (A, B). Aynı şekilde GF109203X'in ortamda Ang II uyarımı olmadan da Akt/PKB fosforilasyonunu düşürdüğü gözlenmektedir (A, B). Spesifik bir Src protein kinaz inhibitörü olan PP2'nin, 30 dakika 10 µM'lık uygulamasının ardından hücrelerin 100 nM Ang II ile 10 dakika süreyle inkübasyonları, yalnız Akt/PKB fosforilasyonunda bir düşüşe sebep olmuştur (A, C). Ras proteini inhibitörü olan FPT III ile hücreler 18 saat boyunca 10 µM'lık konsantrasyonu varlığında inkübe edilmiş, akabinde 10 dakika 100 nM Ang II ile uyarılmışlardır. Bu koşullar altında, başta Akt/PKB olmak üzere, Bad, Ras miktarı ve Bad/Bcl-XL kompleks oluşumlarında çok belirgin düşüşler tespit edilmiştir (A, D). 30 dakika, 1 µM EGF reseptör blokörü AG1478 uygulamasının ardından 10 dakika 100 nM Ang II ile inkübe edilen hücrelerde, Akt/PKB fosforilasyonundaki düşüş, yine aynı uygulamada ortamda sadece AG1478 (1 mM) varken Ras aktivasyonundaki kayıp gözlenmiştir (A, E). Spesifik PDGF reseptör blokörü olan AG1295'in 10 µM 24 saatlik uygulamasını takiben hücrelerin 10 dakika 100 nM Ang II ile inkübe edilmeleri sonucunda söz konusu hiçbir proteinin aktivasyonunda bir inhibisyona rastlanmamıştır (A, F). B'den F'e kadar olan şekil dizini gözlemlenen Western-blot sonuçlarının bar-grafigi ifadeleridir.

4.8 VDKH'lerinde Apoptozisin Belirlenmesi ve Ang II'nin Bu Oluşum Üzerine Etkileri

Primer VDKH kültürü ortamında, hücrelerimizi apoptozise yönlendirirken tek başına IFN-γ veya Fas-L'in yetersiz olduğunu tespit ettik (verileri burada gösterilmemiştir). Bunun üzerine, Rosner ve ark. [96] nın 2006 yılında gerçekleştirdikleri çalışmayı baz alarak, kendi laboratuvar koşullarımıza uygun bir şekilde geliştirdik. Buna göre, deneye alınan hücreler 24 saat serum-free ortamda bekletildikten sonra, ortama 100 nM spesifik PI3-K inhibitörü Wortmanin (1 saat inkübasyon), 20 µM Akt/PKB inhibitörü SH-5 (45 dakika inkübasyon) ve 10 µM EGF reseptör blokörü AG490 (30 dakika inkübasyon) ilave edildi ve bu inkübasyonları takiben hücreler 80 µg IFN-γ ve/veya 1,25 µg Fas-L' a 24 saat maruz

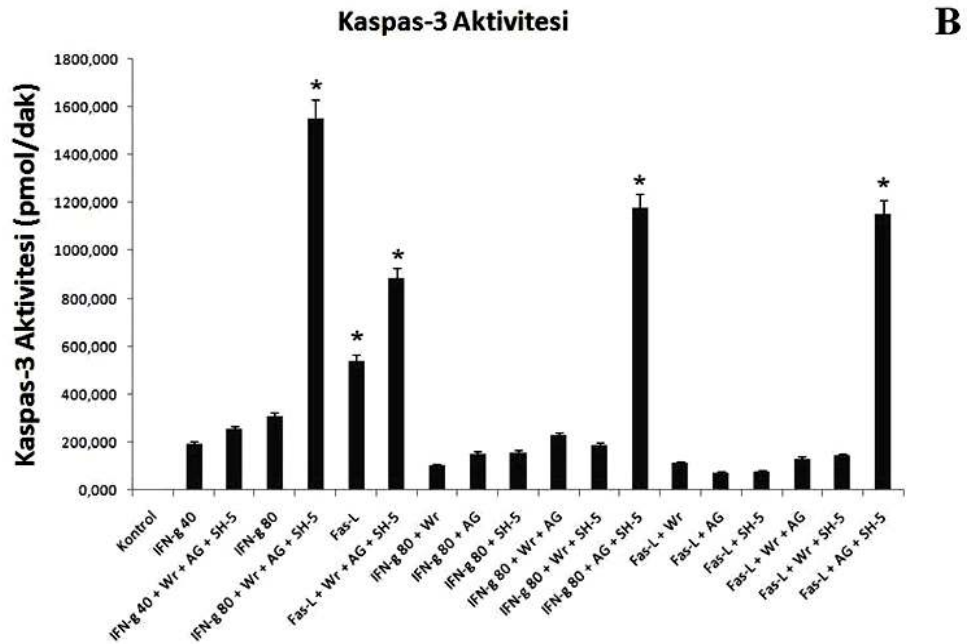
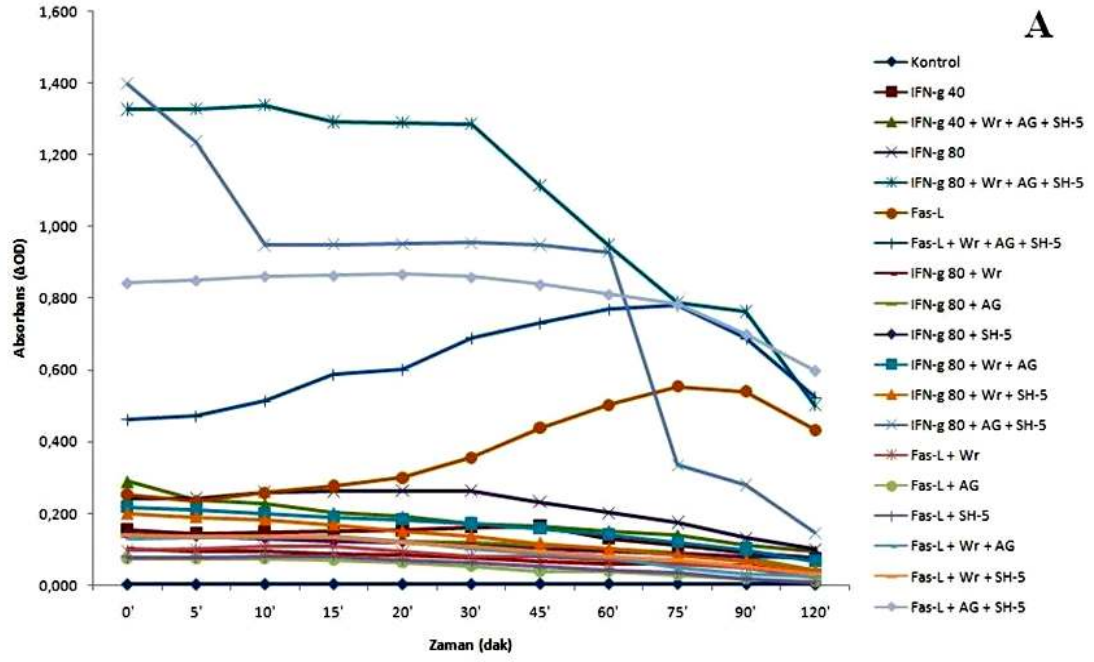
bırakıldılar. Hücrelerin apoptotik hale gelmeleri, spektrofotometrik olarak ölçülen kaspas-3 ve akış sitometresinde tespit edilen Anneksin-V değerleri ile tespit edildi.

4.8.1 “Kaspas-3 Hücresel Aktivite Deney Kiti” ile VDKH’lerinde Apoptozis Sonuçları

Deney ortamına alınan hücrelerde, öncelikle maksimum apoptotik şartları sağlayacak IFN- γ ve Fas-L ile inhibitörler arasındaki ilişki ortaya koyuldu. Bunun için IFN- γ ’nın 40 μ g ve 80 μ g, Fas-L’in 1,25 μ g miktarları ile uygulamada yer alan PI3-K inhibitörü wortmanin (100 nM; 1 sa), Akt/PKB inhibitörü SH-5 (20 μ M; 45 dak) ve EGF reseptör blokörü AG490’nın (10 μ M; 30 dak) çeşitli kombinasyonları 2 saat boyunca devam ettirilen ölçümlerde Şekil 4.13 de belirtildi gibi kullanıldı.

Buna göre, 100 nM Wortmanin, 10 μ M AG490 ve 20 μ M SH-5 uygulamasını takiben gerçekleştirilen 80 mg IFN- γ ve Fas-L (1,25 μ g) inkübasyonlarında kontrol hücrelerine göre yaklaşık 1500 katlık bir kaspas-3 aktivite artışı gözlenmiştir.

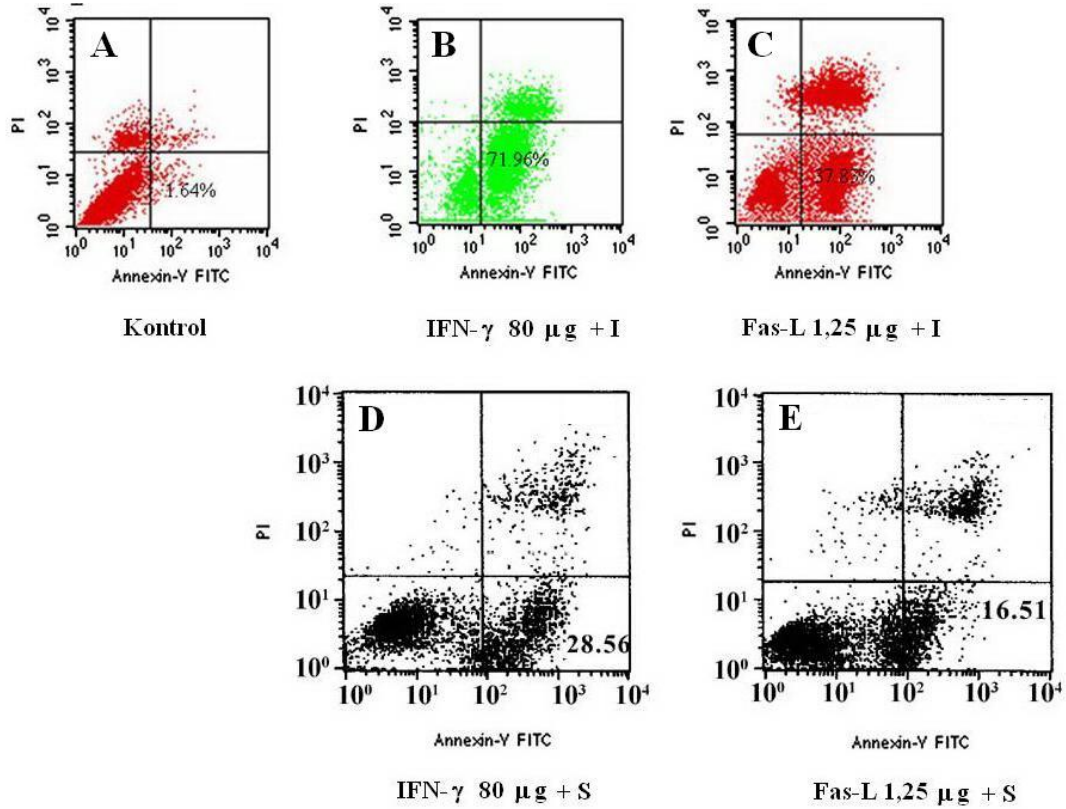
Bununla birlikte, EGF reseptör blokörü AG490 (10 μ M) ve Akt/PKB spesifik inhibitörü olan SH-5’in (20 μ M), PI3-K inhibitörü Wortmanin’den bağımsız olarak kullanıldıkları ve takiben hücrelerin IFN- γ (80 μ g) ve Fas-L (1,25 μ g) ile inkübe edildikleri hücrelerde de kontrole göre 1000 katlık bir kaspas-3 aktivite artışı tespit edilmiştir.



Şekil 4.13 VDKH'lerinde Wortmanin, AG490 ve SH-5 varlığında IFN- γ ve/veya Fas-L Apoptozisi indüklemektedir. 120 dakika boyunca devam edilen kaspas-3 ölçümlerinde (A), 24 saat serum-free ortamda kalan hücrelerden 1 saat 100 nM Wortmanin, 45 dakika 20 μ M SH-5 ve 10 μ M 30 dakika AG490 inkübasyonlarını takiben 24 saat boyunca uygulanan 80 μ g IFN- γ ve 1.25 μ g Fas-L uygulamalarında maksimum kaspas-3 aktivitesine ulaşılmıştır (B). Bununla birlikte, yalnız AG490 (10 μ M) ve SH-5 (20 μ M) inkübasyonlarını takiben gerçekleştirilen IFN- γ (80 mg) ve Fas-L (1,25 μ g) uygulamalarında da kontrole göre yaklaşık 1000 katlık bir artış tespit edilmiştir (B) (* Kontrolle karşı $P < 0,05$). [Şekil üzerindeki yaklaşımlar; IFN- γ 40, 80: IFN- γ 40 ve 80 μ g; Wr: Wortmanin; AG: AG490]

4.8.2 “Anneksin V-FITC Kiti” ile VDKH’lerinde Apoptozisin Belirlenmesi

Caspas-3 kiti ile tespit edilmiş maksimum aktiviteler kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde belirlenen inhibitörler varlığında IFN- γ (80 μ g) ve/veya Fas-L (1,25 μ g) ile uyarılan hücrelerin, Caspas-3 deneyimizle paralellik göstererek apoptozise gittikleri tespit edildi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 VDKH’lerinde apoptozisin Anneksin-V ile ifadesi. Tüm şekillerde 4 e bölünmüş kuadrantın sol alt köşesi ne Anneksin V nede PI ile boyanmış sağlıklı hücreleri ifade etmektedir. Kuadrantın sağ alt köşesi yalnız Anneksin V ile boyanmış apoptotik hücreleri ifade ederken, sağ üst tarafta yer alan ve sadece PI ile boyanmış nöktotik hücreleri göstermektedir. Herhangi bir uygulamaya tabi tutulmamış kontrol hücrelerinde yalnız %1.64’lük düşük bir oranda apoptozis saptanmıştır (A). 10 μ M AG490, 20 μ M SH-5 ve 100 nM Wortmanin uygulamasını takiben 24 saat 80 μ g IFN- γ (B) ve/veya 1,25 μ g Fas-L (C) inkübasyonlarına tabi tutulan hücrelerde, sırasıyla %72 ve %40 a varan apoptotik hücre tespit edilmiştir. Yalnızca AG490 (10 μ M) ve SH-5 (20 μ M) inhibitörlerinin varlığında IFN- γ (80 μ g) (D) ve/veya Fas-L (1,25 μ g) (E) inkübe edilen hücrelerde ise, sırasıyla %29 ve %17’e varan oranlarda apoptotik hücre gözlenmiştir. [I: Wortmanin + AG490 + SH-5; S: Ag490 + SH-5]

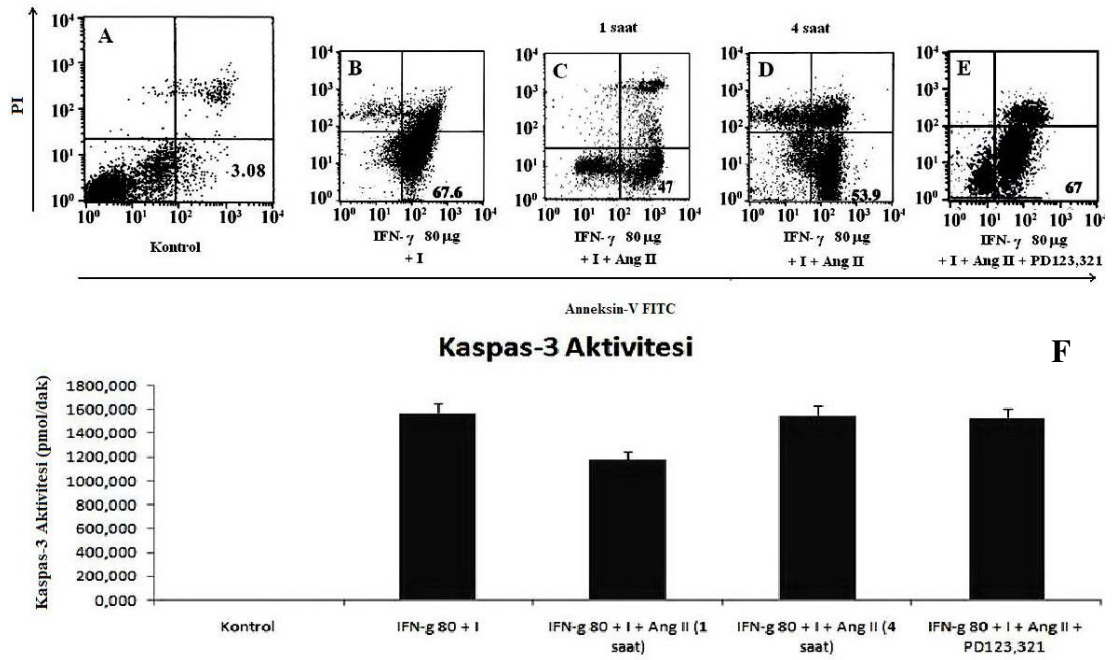
4.8.3 VDKH'lerinde Ang II Apoptotik Etkilerini AT1R Üzerinden Göstermektedir

VDKH'lerinde apoptotik ortam yaratmak için kullandığımız inhibitörler (Wortmanin, AG490 ve SH-5), Ang II'nin bilinen PI3-K Akt/PKB sinyal yolu üzerinden gösterdiği anti-apoptotik etkilerini [50] kısıtladığından dolayı, uzun süreli Ang II (100 nM) inkübasyonlarının yarattığımız apoptotik ortam üzerine etkilerini gözlemledik.

Bu etkileri gözlemlerken, apoptotik düz kas hücreleri 100 nM Ang II ile 1 ila 4 saat aralarında değişen zamanlarda inkübe ettik. Gösterdiği etkinin, hangi reseptör üzerinden olduğunu tespit etmek amacıyla, belirtilen zamanlarda 100 nM Ang II ile inkübasyondan önce ortama bilinen spesifik AT2 reseptör blokörü PD123,312 (10 μ M) 30 dakika boyunca verildi.

Deney sonucunda, ilk 3 saat içerisinde 100 nM Ang II uygulaması ortamdaki kaspas-3 aktivitesini bazal seviyeye göre düşürmediği ve bir miktar arttırdığı, ayrıca, yapılan Anneksin V-FITC deneyleri ile gösterilmiştir (Şekil 4.15).

Ang II bu etkisini, AT1 reseptörü üzerinden gösterdiği, ortama ilave edilen spesifik AT2 reseptör blokörü PD213,312 (10 μ M) varlığında dahi, kaspas-3 ve Anneksin V-FITC deney sonuçlarını tekrarlamasından dolayı tespit edilmiştir (Şekil 4.17).

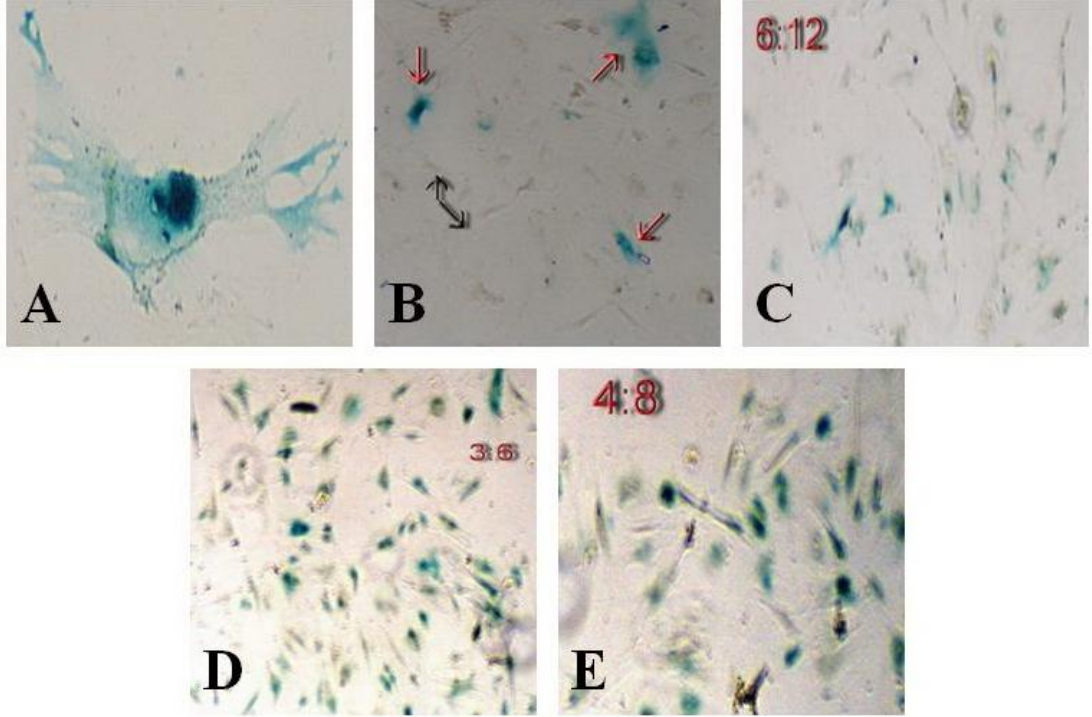


Şekil 4.15 VDKH'lerinin apoptozise yönlendirmelerinin ardından Ang II apoptotik etkilerini AT1R üzerinden devam ettirmektedir. Hiçbir uyarıma maruz kalmamış kontrol hücre grubu (A). VDKH'lerinde, 100 nM Wortmanin, 20 μ M SH-5 ve 10 μ M AG490 uygulamasını takiben 80 μ g IFN- γ ile uyarılarak apoptozise götürülen VDKH grubunda, Anneksin V-FITC ile işaretlenmiş yüzde (%67 – kuadratta sağ altta) apoptotik hücre grubu (B). Belirtilen koşullarda apoptozise yönlendirilmiş hücre grubunun 100 nM Ang II ile 1 saatlik inkübasyonu sonucu apoptotik hücre grubu yüzdesi (%47) (C). Apoptozise götürülen hücrelerin 4 saat 100 nM Ang II ile inkübasyonları sonucunda ortamdaki apoptotik hücre yüzdesi (%54) (D). Apoptotik koşullar altındaki VDKH'leri 30 dakika 10 μ M spesifik AT2R blokörü PD123,321 ile muamelesinin ardından 4 saat 100 nM Ang II ile inkübasyonları neticesinde ortamda meydana gelen apoptotik hücre yüzdesi (%67) (E). Akış sitometresinde Anneksin V-FITC ile işaretlenerek gösterilen aynı apoptotik hücre gruplarında ölçülen kaspas-3 aktiviteleri (pmol/dak) (F). [I: Wortmanin, AG490 ve SH-5]

4.9 VDKH'leri pCH110 DNA'sı ile Tranfekte Olmuşlardır

Primer VDKH kültürünün hangi oranlarda transfektan (FuGENE) ve DNA gerektirdiğini ve transfekte olup olamayacaklarını teyit etmek amacıyla, transfekte olduğunda hücreyi X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid) substratı varlığında indigo-mavisine boyayan pCH110 DNA'sı kullanıldı.

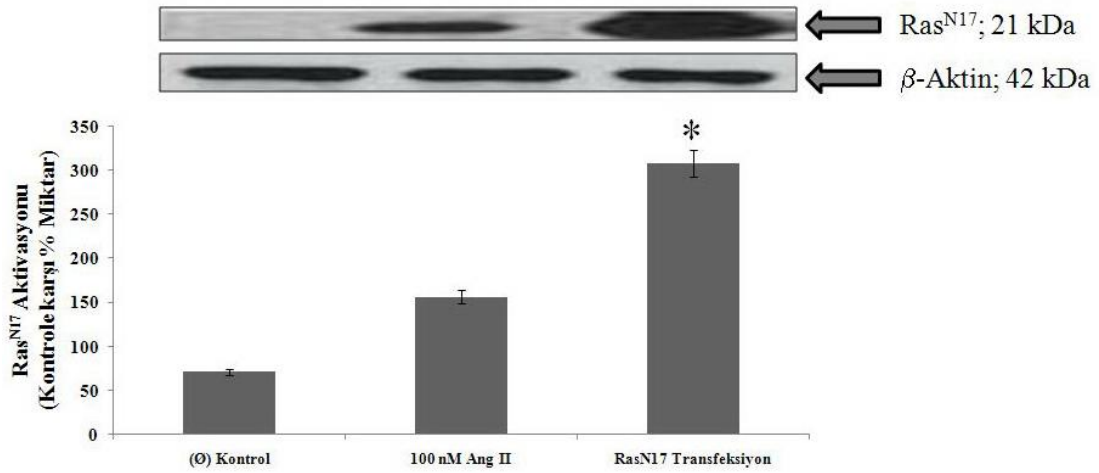
Tablo 3.5 de verilen DNA (μ g)/FuGENE (μ L) oranlarına göre gerçekleştirilen deneylerde en iyi sonucun 3 μ g DNA'a karşılık 6 μ L FuGENE ve yine aynı deneyde 4 μ g DNA'a karşılık gelen 8 μ L FuGENE kullanımında gerçekleştiği bulunmuştur (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 VDKH'lerinin pCH110 DNA'sı ile transfeksiyonu. Transfekte olmuş tek bir VDKH'sinin morfolojik durumunu gösteren fotoğraf (A). 1 µg DNA miktarına karşı 2 µL FuGENE kullanıldığında transfekte olan hücreler (kırmızı oklar) ile halen morfolojik yapısını muhafaza eden hücreleri gösteren fotoğraf (B); hücreler yeterli bir yüzde ile transfekte olmadıkları gözlemlendi.. DNA oranı ile birlikte FuGENE arttırıldığında, (6:12) transfekte olan hücrelerin sayısı azaldığı gibi, canlı hücre sayısında da düşüş gözlenmiştir (C). DNA miktarının 3 ve 4 µg ve buna karşılık olarak FuGENE miktarınında, sırasıyla, 6 ve 8 µL olduğu transfeksiyonlarda (D ve E), hücre yoğunluğunun ve buna transfekte olan hücrelerin fazlalığı dikkat çekmiştir. Yapılan hücre sayımlarında daha fazla transfekte olan düz kas hücre grubunun, 3 µg DNA'ya karşılık 6 µL FuGENE kullanıldığı (E) deney ortamında sağlandığı tespit edilmiştir.

4.9.1 VDKH'lerinde c-H-Ras^{N17} DNA'sının Transfeksiyonu Western-Blot Tekniği ile Gösterilmiştir

pCH110 DNA transfeksiyonundaki 3:6 [DNA (µg): FuGENE (µL)] oranı kullanılarak gerçekleştirilen deney sonrasında gerçekleştirilen Western-blot deneylerinde H-Ras miktarındaki artış gösterilerek (Şekil 4.17), VDKH'lerinin c-H-Ras^{N17} DNA'sı ile hücre içi fazlalığı tespit edilmiştir.



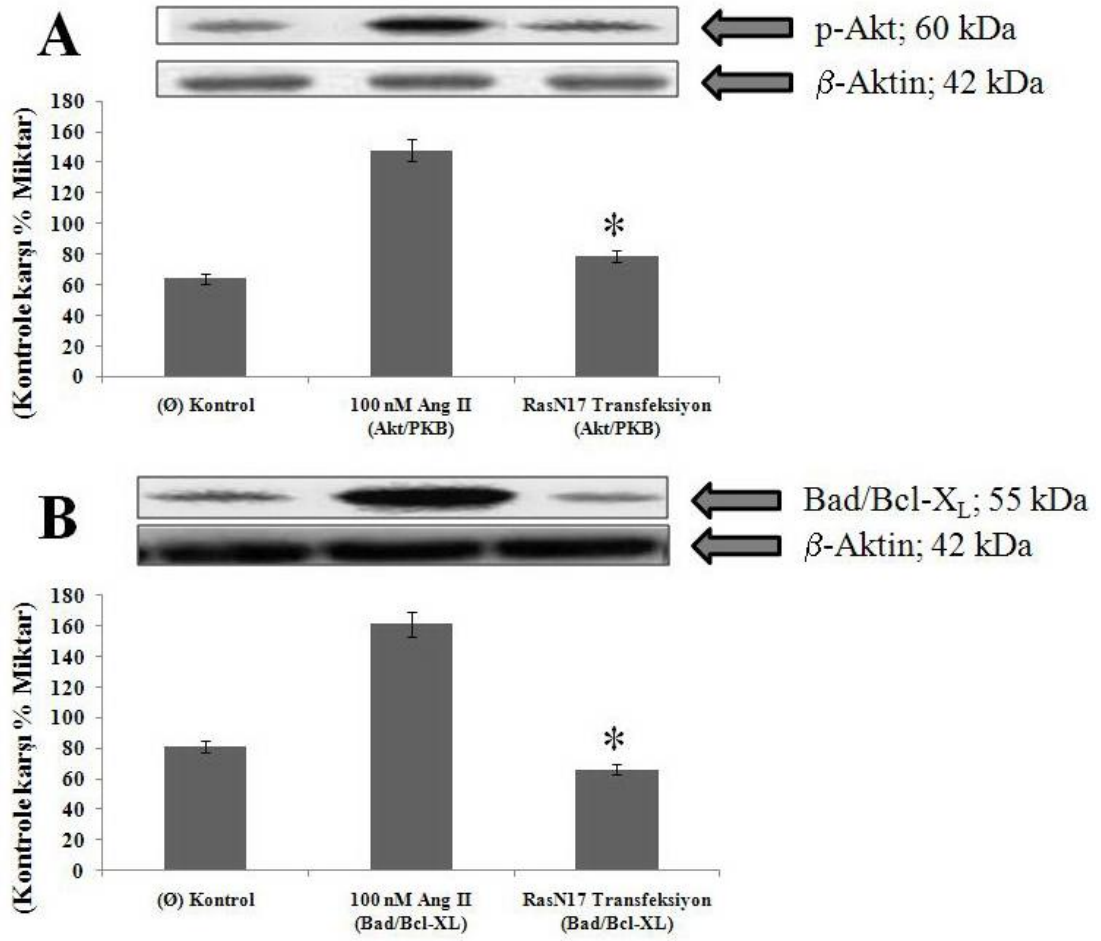
Şekil 4.17 Ras^{N17} transfeksiyonundan sonra artmış Ras miktarı. Normal koşullar altında 100 nM Ang II ile 5 dakika boyunca inkübe edilen VDKH'lerine göre, Ras transfeksiyonu yapılan hücrelerde yaklaşık 3 kat artmış Ras miktarı gözlenmiştir.

4.9.2 Miktar Olarak Fazla H-Ras^{N17} İçeren VDKH'leri Azalmış Akt Fosforilasyonu ve Bad/Bcl-XL Kompleks Oluşumuna Sahiptir

Fazla miktarda H-Ras^{N17} içeren vasküler hücre popülasyonlarının onkojenik hale gelebildikleri [113], EGF reseptör işlevsizliğine [117] ve morfolojik değişimlere [116] sebebiyet verebilmelerinden dolayı, akla gelen PI3-K / Akt hücre anti apoptotik yolunu etkileyebileceği yönündedir.

Bu noktada, Ras transfeksiyonun ardından ortamdaki Akt/PKB fosforilasyonuna ve bunu takiben Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu gözlemlendi. Western-blot yöntemi ile gösterilen aktivasyonlar, bu protein ve kompleksin azaldığı yönündedir (Şekil 4.18).

Aktivasyonunda düşüş tespit edilen Akt/PKB proteini, akla apoptotik şartlarımızı sağladığımız koşulları getirdiğinden, aynı koşullarda ölçülen kaspas-3 ve Anneksin V değerlerinde herhangi bir artış gözlenmedi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 Ras transfeksiyonu sonrasında azalmış Akt/PKB fosforilasyonu ve Bad/Bcl-XL kompleks oluşumu. Fazla miktarda Ras içeren VDKH'lerinde, normal şartlarda 10 dakika 100 nM Ang II ile aktive olmuş Akt/PKB fosforilasyonu (A) ve Bad/Bcl-XL kompleks oluşumu (B), yaklaşık ½ kat azalmış olarak saptanmıştır.

4.9.3 Anti-Apoptotik Faktör Olarak Bilinen Ang II ile Muamele Edilmiş Fazla Miktarda Ras İçeren VDKH'lerinde Akt/PKB Fosforilasyonunda ve Bad/Bcl-X_L Kompleks Oluşumunda Bir Artış Gözlenmedi

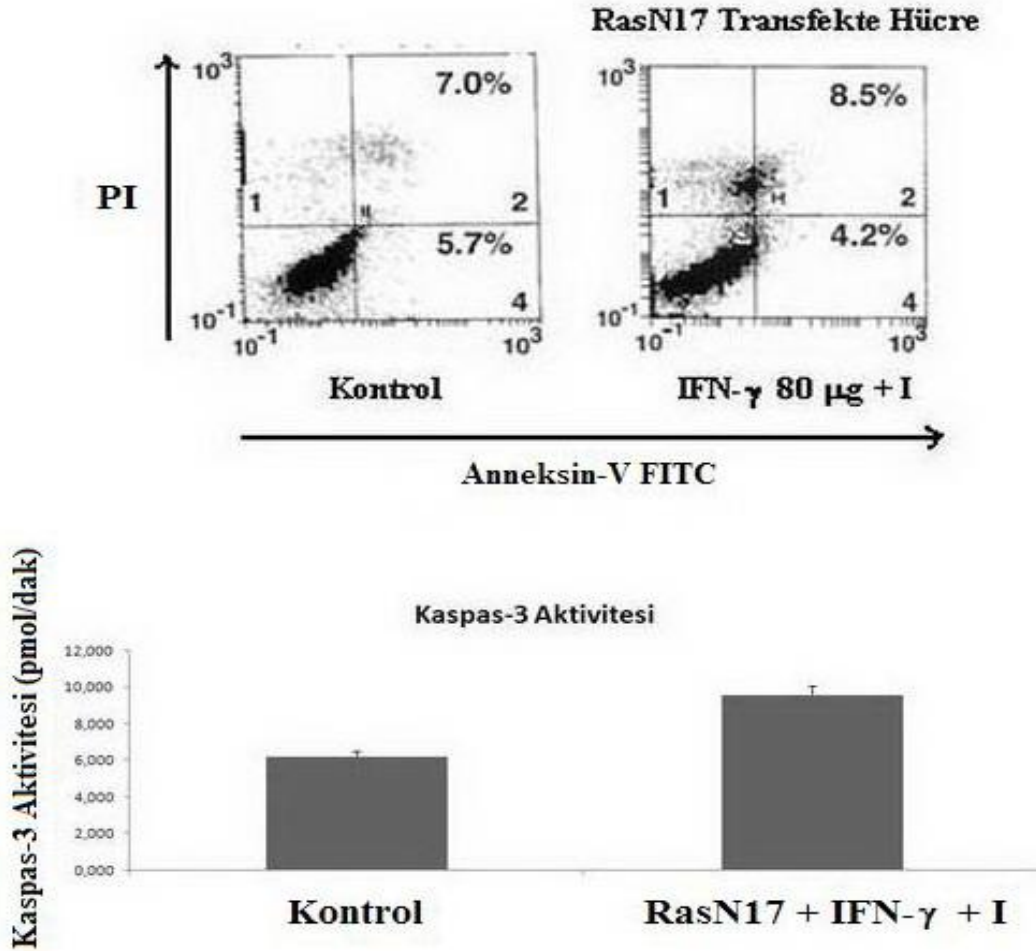
Normal koşullar altında Akt/PKB fosforilasyonunu ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumunu arttırdığını gösterdiğimiz (Şekil 4.2 ve 4.8) Ang II'nin 100 nM 10 dakikalık uyarımında, Ras yoğunluğu fazla olan hücrelerde artmış bir Akt aktivasyonu ve Bad/Bcl-XL kompleks oluşumu gözlemlenmemiştir.

Burada elde ettiğimiz Western-blot sonuçları, Ang II (100 nM) uyarımı olmadan Ras miktarı fazla olan hücrelerde direkt olarak gözlemlediğimiz (Şekil 4.18) sonuçlar ile paralellik arz etmekte olduğundan veriler buraya yansıtılmamıştır.

4.10 Fazla Miktarda Ras İçeren VDKH'lerinde IFN- γ Uyarımlı Oluşturulmaya Çalışılan Apoptozis Başarısız Olmuştur

Spesifik PI3-K inhibitörü olan Wortmanin'nin 100 nM 1 saatlik, Akt/PKB inhibitörü SH-5'in 20 μ M 45 dakikalık ve EGF reseptör blokörü AG490'nın 10 μ M 30 dakikalık daha önceden Ras^{N17} ile transfekte edilmiş VDKH ile inkübasyonunun ardından 24 saatlik 80 μ g IFN- γ uyarımına tabi tutulan ortamda apoptotik belirteçler olan kaspas-3 ve Anneksin V ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Normal şartlar altında, artmış kaspas-3 aktivitesi ve belirgin bir oranda Anneksin V işaretlenmesiyle, apoptotik koşulların oluşturulduğu bu uyarım, Ras ile transfekte edilmiş VDKH'lerinde bir farklılık yaratmamıştır. Sonuç olarak, artmış bir kaspas-3 aktivitesi veya Anneksin V ile işaretli apoptotik hücre yüzdesinde bir değişim ölçülmemiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Ras^{N17} ile transfekte edilen VDKH'lerinde apoptozis uyarılamamıştır. Fazla miktarda Ras içeren VDKH'leri, Wortmanin (100 nM; 1 sa), AG490 (10 mM; 30 dak) ve SH-5 (20 mM; 45 dak), sırasıyla, PI3-K, EGF-R blokörü ve spesifik Akt/PKB inhibitörleriyle belirtilen zamanlarda uyarılmalarının ardından 24 saat boyunca 80 mg IFN- γ 'a maruz bırakılarak apoptozise götürülmeye çalışıldı. Şekilde Uyarılmamış transfekte kontrol grup hücrelerine göre Anneksin V-FITC ile işaretlenmiş apoptotik hücre sayısında ne de kaspas-3 aktivitelerinde belirgin bir artış gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Vasküler yapı, aktif, esnek ve bütünleşmiş bir organdır (Şekil 2.1). Bununla birlikte, statik bir organ değildir; birimler dinamiktir devamlı şekil değiştirirler ve bundan dolayı da fizyolojik ve patolojik uyarılara cevapları artar, azalır ya da yeniden organize olurlar [24]. Sıralanan bu özellikler sebebiyle, literatürde her yıl vasküler hücre grubu ile yapılan artan sayıda çalışmalar bulunmaktadır.

Vasküler yapının başlıca uyaranlarından biri, birçok etkiye sahip multifonksiyonel bir peptid olan Ang II'dir; hücre büyümesinden apoptoza, proenflamatuvar olarak hücre göçü ve proliferasyona ve diğer büyüme faktörlerinin (EGF, PDGF gibi) uyarımına kadar, sorumluluğu çok yönlüdür [33].

Ang II'nin bilinen birçok fizyolojik etkisi, vasküler yapıyı da kapsayan pek çok doku ve hücre yüzeyinde yer alan, yaklaşık 40 kDa ağırlığında ve 359 amino asitten meydana gelmiş, AT1R üzerinden gerçekleşir [11]. Ang II'nin çoğu vazodilatör etkisi AT1R üzerinden gerçekleşse de, AT1R'lerinin antagonize edilmesi ile VDKH pro-apoptotik ve anti-proliferatif değişimlerin AT2R'leri üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir [11].

Ang II'nin uyardığı sinyal yolları, birçok vasküler düz kas hücre proteinini tirozin biriminden fosforiller. Bu durum, AT1 reseptörünün kendisi için de geçerli olduğu gibi, PI3-K'ı da kapsar [37] (Şekil 2.4). PI3-K'ın majör ürünleri hücre yaşamsallığını, metabolizmayı, iskeletsel yapısallaşmayı ve membran trafiğini indükler ve VDKH büyümesinin regülasyonunda önemli bir rol oynadığı da gösterilmiştir [55]. PI3-K, karakteristik olarak tirozin kinaz reseptörleri ile ilişkilidir ve AT1 reseptörleri tarafından da aktive edilir [56, 57].

Akt/PKB, Ang II-uyarımli VDKH'lerinde PI3-K aşağı yolağında önemli bir hedef olarak gösterilmektedir. Akt, p70S6-kinazı aktive ederek protein sentezini regüle eder ve Ca^{2+} kanallarını indükleyerek aortik hücrelerde Ang II-uyarımli Ca^{2+} cevaplarını modüle eder. Akt/PKB, ayrıca, VDKH'lerini apoptozisten koruduğu ve kaspasları inhibe ederek c-Myc ve Bcl-2 uyarımları ile hücre yaşamsallığını düzenlediği gösterilmiştir [57]. VDKH'leri Ang II sinyalizasyonunda PI3-K'ın kesin rolü belirlenememiş olsa da, bu kompleks yol mitojenez ve apoptozis arasındaki dengenin kontrolünde rol oynadığı düşünülmektedir.

Bu noktada, çalışmamızda öncelikli olarak gerçekleştirdiğimiz Ang II doz ve süre uygulamalarında, 100 nM Ang II'nin 10 dakika içerisinde Akt/PKB'i aktive ettiği gözlemlendi (Şekil 4.2 – 4.3). Bu aşamanın ardından yukarıda, yapılan çalışmalarda da gözlemlendiği gibi, PI3-K'ın spesifik inhibitörü olan wortmanin (100 nM) kullanılarak Akt/PKB fosforilasyonunda bir düşüş saptandı (Şekil 4.5).

Yaptığımız bir diğer deneyde, 10^{-5} M AT1R blokörü losartanın 30 dakika içerisinde tamamen Akt/PKB’i bloke ettiği tespit edildi (Şekil 4.4).

Literatür bilgisiyle tamamen paralellik gösteren bu deneylerin ışığında; Ang II’nin Akt/PKB’i AT1R’ü üzerinden aktive ettiği ve bu yolak üzerinde PI3-K’in kesinlikle rol aldığı tekrardan ispatlanmıştır.

Hücre yaşamsallığında çok önemli bir sinyal kaskadı olan PI3-K Akt/PKB yolu [50], bu sinyallerini Akt/PKB’nin fosforilasyonunu takiben esas olarak iki yol üzerinden gerçekleştirir; NF- κ B [136] ve Bad proteinini fosforile ederek, aktif Bad’ın bir mitokondriyal protein olan Bcl-2 aile üyesi Bcl-X_L proteini ile kompleks oluşturarak [137]. Bu noktada apoptotik şartlarda da önem kazanacak olan Bad proteininin [137] fosforilasyonuna ve bu proteinin Bcl-X_L ile yaptığı kompleksin aktivitesine Ang II uyarımında bakıldı (Şekil 4.4 ve 4.8). Buna göre Ang II’nin 100 nM konsantrasyonunda 10 dakikalık bir stimülasyonunun Bad proteininin fosforilasyonunda ve takip eden Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumunda yeterli olacağı tespit edildi. Böylelikle, hücre yaşamsallığında Ang II uyarımını takiben izlenen olası bir sinyal yolunun bu olabileceği gösterildi.

Ang II, diğer büyüme faktörlerinden EGF ve PDGF üzerinde, bu reseptörlerin transaktivasyonunda da rol almaktadır [138]. Bu etkisinde, özellikle bir protein kinaz olan Src’nin rolü de literatürde gösterilmiştir [139]. EGF’in Akt/PKB uyarımındaki rolü [140] düşünülecek olursa, Ang II’nin Akt/PKB fosforilasyonu üzerine EGF reseptör transaktivasyonu üzerinden ne kadar etkili olabileceği, Ang II’nin Akt/PKB üzerindeki etkilerini yalnız PI3-K üzerinden göstermediğinin bir kanıtı olabilir. Bu düşünce ile spesifik Src inhibitörü PP2 (10 μ M; 30 dk) ve EGF-R blokörü AG1478’in (1 μ M; 30 dk) kullanılması ile Akt fosforilasyonu gözlemlendi (Şekil 4.12). Elde ettiğimiz veriler ışığında, Src’nin Akt fosforilasyonunda kısmen rol oynayabileceği, EGF-R’nün de bu fosforilasyonda etkili olduğudur. Literatürde de, ortama dışarıdan verilen EGF’in, reseptörü bloke olduğunda Akt fosforilasyonunda bir düşüş olduğu yönündedir [141].

VDKH’lerinde, Ang II uyarımına bağlı olarak aktiveşen PLC ve PKC gibi tirozin kinazlar aynı zamanda PI3-K’in da hedef moleküllerindendir [142, 143]. PLC’nin vasküler yenilenmede ve proliferasyonda [37] ve PKC’nin de özellikle hipertrofik sinyal yollarındaki etkisini PI3-K üzerinden gerçekleştirdiği bilinmektedir [37]. Bizde normal şartlar altında, kullandığımız spesifik PKC inhibitörü GF109203X (2 μ M; 5 dk) (Şekil 4.12) varlığında Akt/PKB fosforilasyonunda geçici bir inhibisyon gözlemledik. Aynı konsantrasyonda devam eden sürelerde gerçekleştirdiğimiz deneylerde (verileri sunulmamıştır) Akt/PKB fosforilasyonunu arttığı gözlemlendi. Aynı, geçici ve fazla olmayan düşüş Bad fosforilasyonunda da gözlenmiştir (Şekil 4.12). Bu noktada literatürde kesin bir bulguya rastlamamakla beraber, Evangeline ve ark tarafından 2003 yılında yapılan bir çalışmada [144] insülin uyarımlı Akt aktivasyonunun Ang II tarafından PKC- α üzerinden inhibe edildiği ve deney esnasında 30 dakika boyunca 2 μ M GF109203X inhibitörü kullanıldığı gösterilmiştir. Spesifik PLC inhibitörü U73122 ile yaptığımız deneylerde herhangi inhibisyona rastlamadığımız için sonuçları çalışmamızda gösterilmemiştir.

Ras proto-onkogen ailesi, memeli hücrelerinin farklılaşma ve büyümesini regüle eden birçok 21-kDa'luk guanin nükleotid-bağlayan proteinlerden oluşur [107]. Ras aktivitesini regüle eden iki protein ailesi saptanmıştır; Bunlar GDP'nin salınımını katalizleyen guanin nükleotid-salınım faktörleri ve Ras inaktivasyonunu ve GTP hidrolizini çabuklaştıran GTPaz-aktifleyici proteinlerdir [112]. Son yapılan çalışmalarda da, Ras'ın, VDKH'lerinde farklılaşma ve büyümenin kritik bir regülatuar molekül olduğu saptanmıştır [116].

VDKH'lerinin c-H-Ras onkogeni ile transfeksiyonu, morfolojik değişimler, tutarsız büyüme, gelişmiş mitojenik cevapsızlık ve kazanılmış EGF cevapsızlığı ile karakterize bir transformasyon işlemi, uyarır [117]. Söylenenlerin ışığında, aterojenesis ve karsinojenesis arasında, VDKH'lerinde büyüme-ilişkili sinyal iletimini onkogenik Ras'ın etkileme kabiliyeti, Ras'ın aterojenik işlemde rol alabileceğini düşündürmektedir [118].

Literatürdeki birçok veri, özellikle hücre yaşamsallığında ve hücre davranışı etkileyen efektör yolları ve Ras'ın kendisinin önemli bir rol oynayabileceği yönündedir.

İşte bu noktada, biz de, öncelikli olarak normal şartlar altında VDKH'lerinde Ras molekülünün, Ang II'nin doz ve süre uygulamalarına verdiği cevabı gözlemlemek istedik. İlk olarak Ang II'nin çeşitli konsantrasyonlarında hazırladığımız deney düzeneği içerisinde 100 nM Ang II uygulaması, Ras'ın miktar artışıdaki maksimum doz olarak tespit edildi (Şekil 4.6). Ardından, 100 nM Ang II uygulamasının sabit olduğu zaman skalasında, Ras miktarının ilk iki dakika içerisinde arttığı ve geçen yarım saat içerisinde bu artışın düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.7).

Bu sonuçlar, Ras'ın Ang II tarafından indüklenebildiğini ve Ras'ın bir membran proteini olduğu göz önüne alındığında, literatürde bulunan çalışmalarla da [145, 146] paralel olarak ilk iki dakika içerisinde reaksiyonun gerçekleştiğini doğrulamaktadır. Ayrıca, gösterilen Ras seviyelerinin sitozoldeki fraksiyonu olduğu, gerçekleştirdiğimiz deney prosedürü tarafından desteklendiği düşünüldüğünde, proteinin membran fraksiyonuna ayrıca bakılmasına gerek kalmamıştır.

Ang II uyarımına bağlı olabileceğini gösterdiğimiz Ras miktarındaki artış, kendi spesifik inhibitörü FPT III (10 μ M; 18 sa) uygulamasını takiben 2 dakika 10 nM Ang II ile inkübe edilen VDKH kültürü ortamında Akt/PKB fosforilasyonunu bloke etmiştir. (Şekil 4.12). Bu sonuç, Ang II uyarımının Ras proteini üzerinden Akt/PKB fosforilasyonuna olan etkisini doğrulamaktadır. Benzer bir inhibisyon EGF-R blokörü AG1478 varlığında da tespit edilmiştir (Şekil 4.12). Böylelikle EGF-R'nün Ras üzerinden Akt/PKB fosforilasyonuna olan etkisi gösterilmiştir.

Buraya kadar bulmuş olduğumuz sonuçlar, Ang II'nin hem PI3-K üzerinden hem de EGF-R transaktivasyonunu takiben Ras proteininin rol aldığı sinyal yolu

üzerinden Akt/PKB üzerinde etkili olduğunu ortaya koymaktadır ki, bu da literatür bilgileriyle paralellik göstermektedir.

Apoptozis, normal gelişim esnasında, intrinsek sinyaller tarafından tetiklenebilir. Böyle bir durum, bağlantının kaybolması veya hemodinamik parametrelerdeki değişimler, yaşamsal faktörlerin geri çekilimi, bir iç saate cevaben, hücrenin kendini-yok etmesine (hücre intiharı, programlı hücre ölümü) dayanan bir iç programı aktive etmesiyle oluşur [63]. Her hücre, aktif bir sinyal ile aksi söylenmediği takdirde, kendini-yok edecek yolağa bağlanmaya hazır intihar mekanizmasının tüm birimlerini barındırır.

VDKH apoptozisi, *in-vitro* olarak, protein kinaz c inhibitörleri, kalsiyum kanal blokörleri, ACE inhibitörleri, cAMP-bağımlı protein kinaz stimülatörleri [94] ve metelloproteinaz tip 3 doku inhibitörleri [95] gibi birçok faktör tarafından, indüklenabilir. Buna karşın, bu faktörlerin pro-apoptotik etkilerinin klinik tatbikata uygunlukları halen tartışılmaktadır.

VDKH'leri ölüm reseptörü Fas'ı eksprese edebilirler, fakat Fas'ın kısmi olarak intrasellüler sekestrasyonuna bağlı olarak göreceli bir biçimde Fas-uyarımli apoptozise dayanıklılık gösterir [96]. Plaklarda mevcut olan enflamatuar sitokinlerden IFN- γ VDKH'lerini Fas-L-uyarımli ölüme götürebilir [96].

Aslında, monositler/makrofajlar, direkt olarak VDKH apoptozunu Fas veya TNF-R1 [100-102], nitrik oksit ile [101] ve interlökin-1 β , TNF- α gibi sitokinler ile indükleyebildiği gibi, enflamatuar hücrelerden salınan IFN- γ [92] ile de VDKH'lerini apoptozise duyarlı kılabilir. Fas'ın hücre yüzeyine gönderilmesi, VDKH ölümünü oluşumu için önemli bir mekanizma olabilir [96].

Yapılan öncül çalışmalarda (verileri burada gösterilmemiştir), VDKH kültürü ortamına verilen çeşitli konsantrasyonlardaki IFN- γ ve Fas-L sonrasında gerçekleştirilen kaspas-3 ve Anneksin V-FITC ile işaretlenmiş hücrelerin akış sitometresindeki verileri, yukarıda bahsi geçen çalışmaları doğrularcasına, hücrelerin apoptotik bir ortamdan uzak olduğunu göstermiştir. Bu ortamı, yaratabilmek amacıyla Rosner ve ark'nın [96] yaptığı çalışmayı manipüle ederek, materyal ve metod da bahsedilen kendi şart ve koşullarımız altında VDKH kültürü ortamına uyguladık. Gözlemlenen sonuçlar, kaspas-3 ve Anneksin V-FITC verileri (Şekil 4.13 ve 4.14), hücrelerin apoptoza gittiğini teyit etmiştir.

Apoptotik ortamı yaratırken kullandığımız inhibitörler dikkat çekicidir. Her biri (Wortmanin, PI3-K inhibitörü; SH-5, Akt/PKB inhibitörü; AG490, EGF-R blokörü) hücrenin yaşamsallığını korurken izlediği sinyal yolları üzerinde yer alan moleküllere ait blokörlerdir. Özellikle, deneylerimizin en başında, literatürdeki verileri doğrularken, Ang II'nin anti-apoptotik bir ajan olduğunu ve hücre içerisinde bu sinyallerini iletmek için PI3-K Akt/PKB yolunu kullandığını hatırlamamız gerekir. Biz de, bu noktada, Ang II'nin anti-apoptotik etkilerini ortaya çıkarmak için, etkin konsantrasyonu olarak tespit ettiğimiz 100 nM'lık miktarını, daha önceden

apoptozise götürdüğümüz VDKH ortamına 4 saate kadar uyguladık (Şekil 4.15). Bu süre zarfında, uygulamadan beklentimiz, hücrelerdeki apoptotik aktivitenin düşmesi yönündeydi. Ne var ki, düşüncelerimizin tam tersine, ilk saatten 4 saate kadar 100 nM Ang II ile inkübe edilmiş apoptotik hücre kültürü ortamı; uygulamanın ilk saatindeki kaspas-3 aktivasyonunda ve Anneksin V-FITC ile işaretli apoptotik hücrelerde, Ang II uyarımına tabii olmamış apoptotik hücre grubuna göre bir düşüş görülse de (istatistiksel olarak değerli görülmemiştir), kontrol grubu ile kıyaslandığında halen 1300 kata varan bir fark gözlenmiştir. 4 Saatlik Ang II inkübasyonunun sonunda ise, ulaşılan değerler, apoptoza giden hücrelerin göstermiş olduğu aktiviteye yaklaşmıştır (Şekil 4.15). Aynı anda gerçekleştirilen ve Ang II'nin bu süreçte hangi reseptör üzerinden aktivitesini devam ettirdiğini belirlemek amacıyla, ortama spesifik AT2 blokörü PD123,321 (10 µM; 30 dak) verildi. Bu da apoptotik etkinin AT1R üzerinden devam ettiğini gösterdi (Şekil 4.15).

Gözlemlediğimiz bu sonuç, literatürde Ruiz ve ark'nın [147] gerçekleştirmiş olduğu çalışmayı doğrular niteliktedir. Ancak, Ruiz ve ark'nın çalışmasında, söz konusu edilen intrasellüler Ang II'dir. Bu da, çalışmamızın bu noktasında, Ang II'nin apoptotik aktivitesini devam ettirmek için kullandığını öne sürdüğümüz AT1R'nün de bloke edilip, verilerimizin tekrarlanması gerekliliğini göstermektedir. Ekstrasellüler olarak tatbik edilmiş Ang II varlığında, AT1-R blokörü Losartan'nın kullanıldığı bir deney düzeneğinde, yarattığımız apoptotik ortamın halen aktivitesini devam ettirmesi, bizim bulduğumuz sonuçları daha pekiştireceği kanaatindeyiz.

Apoptotik VDKH kültürü ortamında gerçekleştirdiğimiz bu deneyler, hücre içi Akt/PKB aktivitesinin azalması ile birlikte hücrenin yaşamsallığa giden sinyal yollarından en önemlilerinden birinin PI3-K/Akt yolunun olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte Şekil 4.14 de göstermiş olduğumuz bir sonuçta, Akt/PKB'i hücrenin yaşam savaşında verdiği bu mücadelede bir adım öne çıkarmaktadır. Şekil 4.14 de yer alan kaspas-3 aktivitelerinden biri hayli dikkat çekicidir; Apoptotik ortamın sağlanmasında, yalnız Akt/PKB ve EGFR blokörünün yer aldığı deney düzeneğinde de, kaspas-3 aktivitesi kontrole göre yaklaşık 1000 kat artmış gözükmektedir.

PI3-K inhibitörü Wortmanin ortamda bulunmazken, VDKH'lerinin Akt inhibitörü SH-5 ve EGFR blokörü AG1478 varlığında kayda değer bir apoptotik ortam sunuyor olması, Akt/PKB'nin hücrenin yaşamsallık/apoptozis dengesinde nasıl önemli bir kavşak molekülü olabileceğini göstermektedir. Bunun yanında, aynı ortamda halen PI3-K'ın baskılanmamış olması, Ang II'nin olası bir anti-apoptotik etkisini gösterebilmesi bakımından, yine bizim bir açığımız gibi görülmektedir.

Ras proto-onkogen ailesi, memeli hücrelerinin farklılaşma ve büyümesini regüle eden birçok 21-kDa'luk guanin nükleotid-bağlayan proteinlerden oluşur [107]. Bu GTPazlar, mitojenezis sırasında büyüme-ilişkili gen ekspresyonlarının modülasyonlarını da içeren birçok cevabı doğuran hücre yüzey reseptör tirozin kinazların aktivasyonlarını eşleştirir [108, 109].

Yabani-tip Ras'ın fazla miktarlarda bulunduğu, NIH/3T3 hücre kültürlerinde onkojenik transformasyon ile ilişkili bulunduğu [113] gibi transgenik farelerde

tümörlerin gelişmesinde de rol aldığı saptanmıştır [114]. Ras mutantlarının laboratuvar hayvanlarında [103] olduğu kadar insanlarda da [115] tümör oluşumuna katkı sağladığı vurgulanmıştır. Son yapılan çalışmalarda da, Ras'ın, VDKH'lerinde farklılaşma ve büyümenin kritik bir regülatuar molekül olduğu saptanmıştır [116].

Biz de yukarıda bahsi geçen literatür bilgilerine dayanarak, VDKH'lerimizin Ras geni ile transfeksiyonunu gerçekleştirdik (Şekil 4.17). Öncelikli amaç, Ras transfeksiyonu ile kültüre edilmiş VDKH'lerinde onkojenik bir tablo yaratmaktır. Ancak, gerçekleştirdiğimiz transfeksiyon geçici olduğundan (hücrelerin pasajlanması ile genetik aktarım ortadan kalkacağından), fazla miktarda Ras içeren hücrelerimizde, onkojenik, tümör oluşturacak şartları gösterebilmek açısından kullanmış olduğumuz bir hayvan modeli deneyi bulunmamaktadır.

Ras proto-onkogen ailesinin, göstermiş olduğu karakterden (farklılaşma ve büyümeyi regüle etme [114]; onkojenik transformasyon [113] gibi) yola çıkarak, 10 dakika 100 nM Ang II ile uyarılmış fazla miktarda Ras içeren VDKH'lerinde özellikle Akt/PKB ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu aktivitelerine Western-blot tekniği ile bakıldı (Şekil 4.18). Yüksek miktarlarda Ras barındıran hücrelerde, Ang II uyarımını takiben, Akt/PKB fosforilasyonunu ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumunun düştüğünü gözlemlendi.

Onkojenik veya kanser hücreleri ele alındığında, kabaca apoptotik mekanizmaların durdurulduğu, hücrenin immortal olarak devamlılığını sağladığı şartlar düşünüldüğünde, Akt/PKB tarafından fosforillenerek aktif halde bulunamayan Bad proteininin Bcl-X_L ile kompleks oluşturması ve hücre tarafından yaşamsallığın desteklenmesi mümkün olmayabilir. Gerçekleştirdiğimiz Ras transfeksiyonu ile immortal hale dönüşmesi olası VDKH kültüründe, böyle bir aktivite düşüşünü gözlemlemekte kaçınılmazdı.

Son olarak, fazla miktarda Ras içeren VDKH'lerini, Wortmanin (100 nM), SH-5 (20 µM) ve AG490 (10 µM) varlığında belirlemiş olduğumuz 80 µg IFN-γ ile apoptoze sürüklemek istedik. Ancak, saptamış olduğumuz kaspas-3 aktiviteleri ve Anneksin V-FITC işaretli hücrelerin akış sitometresinde göstermiş oldukları yüzdelere dayanarak, normal koşullar altında apoptoza sürüklemiş olduğumuz hücrelerdeki verilerle kıyasla, hiçbir aktivite, dolayısıyla apoptozis tespit edilmedi.

Öncelikli olarak böyle bir sonuç, hücrenin yaşamsallığına giden sinyalizasyon yolu üzerinde önemli bir rol oynayan Bad/Bcl-X_L kompleks oluşum seviyelerindeki düşüşün hücreyi daha kolay bir şekilde apoptoza yönlendirebileceği yönünde olmasına karşın tam tersinin, hücrenin apoptotik aktivite göstermemesi fazla miktarda Ras içeren VDKH'lerimizin immortal hale gelmiş olabileceği düşüncesini pekiştirmektedir. Bununla beraber, böyle bir durumda hücrelerin apoptoza sürüklenmeleri için gereken sinyal yolu PI3-K Akt/PKB yolundan farklı olabilir.

Toparlayacak olursak, kısaca, normal ve apoptotik şartlar altında Akt/PKB molekülü, hücrenin yaşamsallığı ile ölümü arasında yer alan bir kantar misali gibi

hücreyi her iki yönde dengede tutmaktadır. Elbette, bu savun desteklenmesi ve olası onkojenik (tümörojenik) şartların kabul gördüğü sistemler altında da bu çalışmaların desteklenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda topladığımız bu verilerin ileriki çalışmalara güvenilir bir kaynak olabileceği düşüncesindeyiz.

SONUÇLAR

Çalışmamızın sonucunda, normal şartlar altında VDKH'lerinde Ang II uyarımına cevaben Akt/PKB, Ras miktarı ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumuna bakılmıştır. Bununla birlikte, aynı sinyal yolu üzerinde kullandığımız Ang II reseptör blokörü Losartan, PI3-K inhibitörü Wortmanin, PKC inhibitörü GF109203X, Src inhibitörü PP2, Ras inhibitörü FPTIII ve spesifik EGF ve PDGF reseptör blokörlerinin (sırasıyla AG1478 ve AG1295), Akt/PKB, Bad, Ras miktarı ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu üzerine olan etkileri saptandı.

Bu aşamanın ardından VDKH'leri H-Ras ile transfekte edilmiş ve bu transfeksiyonun gerçekleştirildiği hem pCH110 eksprese eden kontrol hücreleri ile hem de Western-blot tekniği ile gösterildi. Ardından, fazla miktarda Ras içeren VDKH'lerinde Akt/PKB ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu düzeyleri incelendi.

Primer VDKH'leri, Wortmanin (PI3-K inhibitörü), SH-5 (Akt/PKB blokörü) ve AG490 (EGF-R inhibitörü) varlığında IFN- γ ve/veya Fas-L uyarımıyla apoptozise götürülmüş ve pozitif bulguları Anneksin-V FITC ile akış sitometresinde ve kaspas-3 spektrofotometrik ölçümleriyle desteklendi.

Apoptotik VDKH'lerinde Ang II'nin etkisine, spesifik AT2 reseptör blokörü PD123,321 varlığında bakılarak, Ang II'nin apoptotik etkiyi devam ettirdiği ve bunu AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştirdiği akış sitometresi ve kaspas-3 spektrofotometrik deneyleri ile gösterildi.

İzolasyonu ve primer kültürü yapılan vasküler düz kas hücrelerinin α -aktinleri boyanarak vasküler düz kas hücresi olduğu gösterilmiştir. İzole edilen hücrelerde endotel hücresi bulunmadığı tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz western blot, akış sitometresi ve kaspas-3 spektrofotometrik sonuçları aşağıdaki gibidir;

1. VDKH'lerinde Akt/PKB uyarımı için 100 nM Ang II'nin 10 dakikalık bir uyarımını gerektirmiştir.
2. VDKH'lerinde Akt/PKB uyarımı AT1 reseptörü üzerinden, kendi spesifik inhibitörü olan losartanın 10^{-5} M konsantrasyonunda 30 dakikada tamamen baskılandı.
3. VDKH'lerinde Akt/PKB uyarımı PI3-K üzerinden gerçekleşmektedir. Kullandığımız spesifik PI3-K inhibitörü wortmaninin 100 nM'lık derişimi 1 saat içerisinde uyarımı baskıladı.
4. VDKH'lerinde Ang II uyarımı ile Bad fosforilasyonu gerçekleşmektedir. Yapılan deneylerde 100 nM Ang II konsantrasyonunun ilk 10 dakika içerisinde Bad'ı aktive ettiği saptandı.

5. VDKH'lerinde Ang II uyarımı ile Ras miktarında bir artış gerçekleşmektedir. Yapılan deneylerde 10 nM Ang II konsantrasyonunun ilk 2 dakika içerisinde Ras'ın miktarını arttırdığı bulundu.
6. VDKH kültüründe, Ang II uyarımını takiben hücre yaşamsallığında bir belirteç olan Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu saptanmıştır. Buna göre, Ang II'nin 100 nM'lık bir konsantrasyonu 15 dakika içerisinde kompleks oluşumunu gerçekleştirdi.
7. VDKH'lerinde Akt/PKB aktivasyonu Ang II'nin AT1 reseptörü üzerinden gerçekleşmektedir. Kullanılan spesifik AT1 reseptör inhibitörü Losartan, 10⁻⁵ M konsantrasyonda 30 dakika içerisinde Akt/PKB fosforilasyonunu inhibe ettiği bulundu.
8. VDKH'lerinde 100 nM Ang II uyarımı ile Akt/PKB aktivasyonunun PI3-K üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir. Buna göre, spesifik PI3-K inhibitörü Wortmanin'in 100 nM 1 saatlik uygulaması Akt/PKB fosforilasyonunu inhibe ettiği saptandı.
9. Primer VDKH kültüründe kullandığımız diğer inhibitörlerin; GF109203X (PKC inhibitörü), PP2 (Src inhibitörü), FPTIII (Ras inhibitörü), AG1478 ve AG1295 (sırasıyla, EGF-R ve PDGF-R blokörleri) Akt/PKB, Bad aktivasyonları, Ras miktarı ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumu üzerine olan etkileri aşağıdaki gibidir;
 - a. GF109203X'in 5 dakika 2 µM'lık uygulamasını takiben 100 nM Ang II ile uyarılmış hücrelerde belirgin olarak p-Akt aktivasyonunda bir inhibisyon tespit edildi.
 - b. Spesifik Src inhibitörü PP2'nin 30 dakikalık 10000 nM'lık uygulamasını takiben 100 nM Ang II ile uyarılan hücrelerde sadece Akt fosforilasyonunda bir düşüş gözlemlendi.
 - c. Ras inhibitörü FPT III'ün 10 µM 18 saatlik inkübasyonu, hücrelerin 24 saat boyunca serum-free ortama terk edilmesinden 6 saat sonra başlatılmıştır. Bu zaman sonunda 10 dakika 100 nM Ang II ile uyarılan hücrelerde, Akt ve Bad fosforilasyonunda, Ras miktarında ve Bad/Bcl-X_L kompleks oluşumunda, istatistiksel olarak da belirgin bir düşüş gözlemlendi.
 - d. EGF-R blokörü olan AG1478, 100 nM 10 dakika Ang II uygulamasından önce 1 µM ve 30 dakika boyunca hücrelerle inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda yalnız Akt fosforilasyonunda anlamlı bir düşüş saptandı.

- e. Hücrelerin 24 saat serum-free ortamda bırakılmalarıyla aynı anda başlatılan 10 μ M'lık spesifik PDGF-R blokörü AG1295 uygulamasının ardından, 10 dakika 100 nM Ang II uyarımına maruz kalan hücrelerde herhangi kayda değer bir inhibisyon gözlemlendi.
10. VDKH'leri, 1 saat 100 nM Wortmanin, 45 dakika 20 μ M SH-5 ve 30 dakika 10 μ M AG490 uygulamalarını takiben 80 μ g IFN- γ ve/veya 1.25 μ g Fas-L uyarımı ile apoptozise götürüldükleri akış sitometresi ve kaspas-3 spektrofotometrik deneyleriyle saptandı.
11. VDKH'lerinde Ang II'nin anti-apoptotik etkilerini PI3-K – Akt/PKB yolağı üzerinden gerçekleştiriyor olması ve hücrelerimizin apoptotik şartlara götüren uygulamanın bu moleküllerin inhibisyon şartına dayanmasından dolayı, apoptotik şartlarda 100 nM Ang II ile 1 ila 4 saat aralarında değişen zamanlarda gerçekleştirilen inkübasyonlar neticesinde, Ang II'nin apoptotik etkilerini AT1 reseptörü üzerinden gerçekleştirdiği tespit edildi. Bunun için, spesifik AT2 reseptör blokörü PD123,321 (10 μ M; 30 dak) varlığında gerçekleştirilen Ang II uyarımları, hücreyi apoptozdan kurtaramadığı gibi, artan kaspas-3 aktivitesi ve Anneksin-V FITC ile boyanan hücre yüzdesinde artış tespit edilmedi.
12. Primer VDKH kültür ortamı H-Ras ile transfekte edildi. Bunun öncesinde kontrol amaçlı pCH110 DNA'sı ile gerçekleştirilen deneylerde 4 μ g DNA ile 8 μ L FuGENE reaktif oranı, hücrelerin transfeksiyonuna yettiği saptandı. Aynı oranlarda H-Ras DNA'sının transfeksiyonu, hücrenin Ras miktarındaki artışına yol açtığı Western-Blot tekniği ile gösterildi. Membrana bağlı bir protein olmasına karşın, hücre içi sitozolik Ras miktarının artışı ve gözlenen etkileri, membraner Ras ölçümlerinin, bu deney düzeneği içerisinde gereksiz kılmıştır.
13. Fazla miktarda Ras içeren VDKH'lerinin, Akt/PKB fosforilasyonu ve Bad-Bcl-X_L kompleks oluşum göstergeleri, normal şartlarda 100 nM Ang II ile 10 dakika boyunca uyarılmış hücreler ile kıyaslandığında, daha az bulundu.
14. Ras over-eksprese eden VDKH'leri, apoptotik şartları yarattığımız inhibitörler (Wortmanin, SH-5 ve AG490) ile muamelesinin ardından IFN- γ ve/veya Fas-L ile uyarıldıklarında apoptozise gitmedikleri Anneksin-F FITC hücre boyamaları ve kaspas-3 spektrofotometrik deneyleri ile tespit edildi.

KAYNAKLAR

1. Bai, H., et al. Regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. Modulation of bad by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Circ Res*, 1999. 85(3): 229-37.
2. Fox, J.C., Shanley J.R. Antisense inhibition of basic fibroblast growth factor induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1996. 271(21): 12578-84.
3. Virchow, R. Cellular Pathology as based Upon Physiological and Pathological Histology. Birmingham, AL, 1858. Classics of Medicine Library: 361.
4. Thomas, W.A., et al. Population dynamics of arterial smooth muscle cells. V. Cell proliferation and cell death during initial 3 months in atherosclerotic lesions induced in swine by hypercholesterolemic diet and intimal trauma. *Exp Mol Pathol*, 1976. 24(3): 360-74.
5. Parkes, J.L., et al, Cultured human atherosclerotic plaque smooth muscle cells retain transforming potential and display enhanced expression of the myc proto-oncogene. *Am J Pathol*, 1991. 138(3): 765-75.
6. Evan, G.I., et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 1992. 69(1): 119-28.
7. Bennett, M.R., Evan G.I., Newby A.C. Deregulated expression of the c-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, interferon-gamma, heparin, and cyclic nucleotide analogues and induces apoptosis. *Circ Res*, 1994. 74(3): 525-36.
8. Bennett, M.R., Evan G.I., Schwartz S.M. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1995. 95(5): 2266-74.
9. Bennett, M.R., et al. Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques to p53-mediated apoptosis. *Circ Res*, 1997. 81(4): 591-9.
10. Kockx, M.M., et al. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 1998. 97(23): 2307-15.

11. Griendling, K.K., Lassegue, B., Alexander, R.W. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1996. 36: 281-306.
12. Bochaton-Piallat, M.L., et al. Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening. *Am J Pathol*, 1995. 146(5): 1059-64.
13. Bellacosa, A., et al. A retroviral oncogene, Akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, 1991. 254(5029): 274-7.
14. Burgering, B.M., Coffey, P.J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, 1995. 376(6541): 599-602.
15. Dudek, H., et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, 1997. 275(5300): 661-5.
16. Bar-Sagi, D., Hall, A. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell*, 2000. 103(2): 227-38.
17. Lin, A.W., et al. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev*, 1998. 12(19): 3008-19.
18. Serrano, M., et al. Oncogenic Ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 1997. 88(5): 593-602.
19. Zhu, J., et al. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev*, 1998. 12(19): 2997-3007.
20. Minamino, T., et al. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*, 2002. 105(13): 1541-4.
21. Benjamin, C.W., Jones, D.A. Platelet-derived growth factor stimulates growth factor receptor binding protein-2 association with Shc in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1994. 269(49): 30911-6.
22. Eguchi, S., et al. Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca²⁺/calmodulin-sensitive tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 1996. 271(24): 14169-75.
23. Shiojima, I., Walsh, K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*, 2002. 90(12): 1243-50.

24. Dubey, R.K., et al. Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1997. 6(1): 88-105.
25. Dursun, A. *Miniatlas - Kardiyoloji*. 1 ed. Vol. 1. 2003: AND Danışmanlık, Eğitim, yayıncılık ve Organizasyon Ltd. Şti.
26. Bornfeldt, K. Intracellular signaling in arterial smooth muscle migration versus proliferation. *Trends Card Med*, 1996. 6: 143-151.
27. Katoh, Y., Periasamy, M. Growth and differentiation of smooth muscle cells during vascular development. *Trends Card Med*, 1996. 6: 100-106.
28. Mulvany, M.J., Aalkjaer, C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev*, 1990. 70(4): 921-61.
29. Schiffrin, E.L. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. *Hypertension*, 1992. 19(2 Suppl): II1-9.
30. Luscher, T.F., Barton, M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*, 1997. 20(11 Suppl 2): II-3-10.
31. Rubanyi, G.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J Cell Biochem*, 1991. 46(1): 27-36.
32. Stein, B.C., Levin, R.I. Natriuretic peptides: physiology, therapeutic potential, and risk stratification in ischemic heart disease. *Am Heart J*, 1998. 135(5 Pt 1): 914-23.
33. Matsusaka, T., Ichikawa, I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu Rev Physiol*, 1997. 59: 395-412.
34. Crackower, M.A., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, 2002. 417(6891): 822-8.
35. Danilczyk, U., Penninger, J.M. *Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney*. *Circ Res*, 2006. 98(4): 463-71.
36. Wolny, A., et al. Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart. *Circ Res*, 1997. 80(2): 219-27.
37. Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*, 2000. 52(4): 639-72.
38. Gasc, J.M., et al. Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. *Hypertension*, 1994. 24(5): 531-7.

39. Chen, X., et al. Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. *Am J Physiol*, 1997. 272(3 Pt 2): F299-304.
40. Bumpus, F.M., et al. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*, 1991. 17(5): 720-1.
41. Ohyama, K., et al. Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type IA. *Regul Pept*, 1995. 57(2): 141-7.
42. Mukoyama, M., et al. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem*, 1993. 268(33): 24539-42.
43. Shanmugam, S., Corvol, P., Gasc, J.M. Angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat. *Hypertension*, 1996. 28(1): 91-7.
44. Bedecs, K., et al. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J*, 1997. 325(Pt 2): 449-54.
45. Munzenmaier, D.H., Greene, A.S. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension*, 1996. 27(3 Pt 2): 760-5.
46. D'Amore, A., Black, M.J., Thomas, W.G. The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension*, 2005. 46(6): 1347-54.
47. Landon, E.J., Inagami, T. Beyond the G protein: the saga of the type 2 angiotensin II receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(1): 15-6.
48. Senbonmatsu, T., et al. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J*, 2003. 22(24): 6471-82.
49. AbdAlla, S., et al. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem*, 2001. 276(43): 39721-6.
50. Mehta, P.K., Griendling, K.K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. 292(1): C82-97.
51. Berk, B.C., Corson, M.A. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res*, 1997. 80(5): 607-16.

52. Dostal, D.E., et al. Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol*, 1997. 29(11): 2893-902.
53. Griendling, K.K., et al. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension*, 1997. 29(1 Pt 2): 366-73.
54. Marrero, M.B., et al. The role of tyrosine phosphorylation in angiotensin II-mediated intracellular signaling. *Cardiovasc Res*, 1995. 30(4): 530-6.
55. Leever, S.J., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D. Signaling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. 11(2): 219-25.
56. Saward, L., Zahradka, P. Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1997. 81(2): 249-57.
57. Takahashi, T., et al. Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1999. 276(6 Pt 2): H1927-34.
58. Cliff, W.J. The aortic tunica media in aging rats. *Exp Mol Pathol*, 1970. 13(2): 172-89.
59. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972. 26(4): 239-57.
60. Hetts, S.W. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*, 1998. 279(4): 300-7.
61. Martin, S.J., et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by over-expression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, 1995. 182(5): 1545-56.
62. Majno, G., Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 1995. 146(1): 3-15.
63. Mallat, Z., Tedgui, A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol*, 2000. 130(5): 947-62.
64. Haunstetter, A., Izumo, S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*, 1998. 82(11): 1111-29.
65. Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G., Rosen, A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*, 1994. 179(4): 1317-30.

66. Rosen, A., Casciola-Rosen, L., Ahearn, J. Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J Exp Med*, 1995. 181(4): 1557-61.
67. Tan, E.M. Autoimmunity and apoptosis. *J Exp Med*, 1994. 179(4): 1083-6.
68. Golstein, P. Controlling cell death. *Science*, 1997. 275(5303): 1081-2.
69. Green, D., Kroemer, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol*, 1998. 8(7): 267-71.
70. Kroemer, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*, 1997. 3(6): 614-20.
71. Ashkenazi, A., Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998. 281(5381): 1305-8.
72. Green, D.R., Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998. 281(5381): 1309-12.
73. Thornberry, N.A., Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science*, 1998. 281(5381): 1312-6.
74. Enari, M., et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 1998. 391(6662): 43-50.
75. Liu, X., et al. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 1997. 89(2): 175-84.
76. Sakahira, H., Enari, M. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 1998. 391(6662): 96-9.
77. Nicholson, D.W., et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 1995. 376(6535): 37-43.
78. Devitt, A., et al. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*, 1998. 392(6675): 505-9.
79. Fadok, V.A., et al. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol*, 1992. 149(12): 4029-35.
80. Fadok, V.A., et al. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol*, 1998. 161(11): 6250-7.
81. Savill, J., et al. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, 1993. 14(3): 131-6.

82. Aupeix, K., et al. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest*, 1997. 99(7): 1546-54.
83. Gidon-Jeangirard, C., et al. Annexin V delays apoptosis while exerting an external constraint preventing the release of CD4+ and PrPc+ membrane particles in a human T lymphocyte model. *J Immunol*, 1999. 162(10): 5712-8.
84. Pollman, M.J., Hall, J.L., Gibbons, G.H. Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype. *Circ Res*, 1999. 84(1): 113-21.
85. Jovinge, S., et al. DNA fragmentation and ultrastructural changes of degenerating cells in atherosclerotic lesions and smooth muscle cells exposed to oxidized LDL in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. 17(10): 2225-31.
86. Nishio, E., Watanabe, Y. Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein down-regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. 226(3): 928-34.
87. von der Leyen, H.E., et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(4): 1137-41.
88. Morishita, R., et al. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *J Clin Invest*, 1994. 94(3): 978-84.
89. Pollman, M.J., et al. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res*, 1996. 79(4): 748-56.
90. Yamada, T., et al. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci*, 1998. 63(19): PL289-95.
91. Geng, Y.J., et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. 16(1): 19-27.
92. Geng, Y.J., et al. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. 17(10): 2200-8.
93. Boyle, J., Bowyer, D.E., Proudfoot, D., Weissberg, P.L., Bennett, M.R. Human monocyte/macrophages induce human vascular smooth muscle cell apoptosis in culture. *Circulation*, 1998. I: 598.

94. Leszczynski, D., et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells. Protein kinase C and oncoprotein Bcl-2 are involved in regulation of apoptosis in non-transformed rat vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol*, 1994. 145(6): 1265-70.
95. Baker, A.H., et al. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 over-expression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest*, 1998. 101(6): 1478-87.
96. Rosner, D., et al. Interferon-gamma induces Fas trafficking and sensitization to apoptosis in vascular smooth muscle cells via a PI3K- and Akt-dependent mechanism. *Am J Pathol*, 2006. 168(6): 2054-63.
97. Bennett, M., et al. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*, 1998. 282(5387): 290-3.
98. Chan, S.W., et al. Sensitivity to Fas-mediated apoptosis is determined below receptor level in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 2000. 86(10): 1038-46.
99. Kockx, M.M. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. 18(10): 1519-22.
100. Boyle, J.J., et al. Human blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by Fas-ligand/Fas interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(9): 1402-7.
101. Boyle, J.J., Weissberg, P.L., Bennett, M.R. Human macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis requires NO enhancement of Fas/Fas-L interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(10): 1624-30.
102. Imanishi, T., et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells is induced by Fas ligand derived from monocytes/macrophage. *Atherosclerosis*, 2002. 161(1): 143-51.
103. Augstein, P., et al. Cell surface trafficking of Fas in NIT-1 cells and dissection of surface and total Fas expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 290(1): 443-51.
104. Stemme, S., et al. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(9): 3893-7.
105. Tellides, G., et al. Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature*, 2000. 403(6766): 207-11.
106. Buono, C., et al. Influence of interferon-gamma on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(3): 454-60.

107. Barbacid, M. Ras genes. *Annu Rev Biochem*, 1987. 56: 779-827.
108. Feig, L.A. The many roads that lead to Ras. *Science*, 1993. 260(5109): 767-8.
109. Yu, C.L., Tsai, M.H., Stacey, D.W. Cellular Ras activity and phospholipid metabolism. *Cell*, 1988. 52(1): 63-71.
110. Hall, A. Ras and GAP--who's controlling whom? *Cell*, 1990. 61(6): 921-3.
111. Downward, J., et al. Stimulation of p21Ras upon T-cell activation. *Nature*, 1990. 346(6286): 719-23.
112. McCormick, F. Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature*, 1993. 363(6424): 15-6.
113. Pulciani, S., et al. Ras gene Amplification and malignant transformation. *Mol Cell Biol*, 1985. 5(10): 2836-41.
114. Mangues, R., et al. Over-expression of the N-Ras proto-oncogene, not somatic mutational activation, associated with malignant tumors in transgenic mice. *Oncogene*, 1992. 7(10): 2073-6.
115. Loktionov, A., et al. Tissue-specific activating mutations of Ha- and Ki-Ras oncogenes in skin, lung, and liver tumors induced in mice following transplacental exposure to DMBA. *Mol Carcinog*, 1990. 3(3): 134-40.
116. Sadhu, D.N., Ramos, K.S. Cyclic AMP inhibits c-Ha-Ras proto-oncogene expression and DNA synthesis in rat aortic smooth muscle cells. *Experientia*, 1993. 49(6-7): 567-70.
117. Sadhu, D.N., et al. c-Ha-RasEJ transfection of rat aortic smooth muscle cells induces epidermal growth factor responsiveness and characteristics of a malignant phenotype. *J Cell Physiol*, 1994. 161(3): 490-500.
118. Weber, T.J., Ramos, K.S. c-Ha-RasEJ transfection in vascular smooth muscle cells circumvents PKC requirement during mitogenic signaling. *Am J Physiol*, 1997. 273(4 Pt 2): H1920-6.
119. Slis, D. Mechanism of Tyrosine kinase. Available from: <http://www.bioinformaticsourses.com/ISB/sp2003/1FMK/mechanism.html>.
120. Yao, R., Cooper, G.M. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*, 1995. 267(5206): 2003-6.
121. Ferrari, G., Greene, L.A. Proliferative inhibition by dominant-negative Ras rescues naive and neuronally differentiated PC12 cells from apoptotic death. *EMBO J*, 1994. 13(24): 5922-8.

122. Arends, M.J., et al. Susceptibility to apoptosis is differentially regulated by c-myc and mutated Ha-Ras oncogenes and is associated with endonuclease availability. *Br J Cancer*, 1993. 68(6): 1127-33.
123. Chen, C.H., Zhang, J. Transfected c-myc and c-Ha-Ras modulate radiation-induced apoptosis in rat embryo cells. *Radiat Res*, 1994. 139(3): 307-15.
124. Fernandez, A., et al. Differential sensitivity of normal and Ha-Ras-transformed C3H mouse embryo fibroblasts to tumor necrosis factor: induction of bcl-2, c-myc, and manganese superoxide dismutase in resistant cells. *Oncogene*, 1994. 9(7): 2009-17.
125. Gardner, A.M., Johnson, G.L. Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 1996. 271(24): 14560-6.
126. Kinoshita, T., et al. Regulation of Bcl-2 expression by oncogenic Ras protein in hematopoietic cells. *Oncogene*, 1995. 10(11): 2207-12.
127. Çetin, A. Kültüre Edilmiş Rat Aortik Düz Kas Hücrelerinde Anjiyotensin II Uyarımı ile p42/p44 MAPK (ERK-1/2) Fosforilasyonunda Fosfolipaz C ve Protein Kinaz C'nin Rolü. *Biyokimya*. 2005, Akdeniz Üniversitesi: Antalya.
128. Gunter, S., Alexander, W., Atkinson, W.J., Gimbrone, M.A. Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cell. *Cell Biology*, 1982. 92: 289-298.
129. Pigault, C., et al. Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *J Mol Biol*, 1994. 236(1): 199-208.
130. Kuypers, F.A., et al. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood*, 1996. 87(3): 1179-87.
131. Mediavilla, M.G., et al. Efficient cold transfection of pea ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase into rat hepatocytes. *J Gene Med*, 2006. 8(3): 306-13.
132. Smith, D.L., Morris, B.J. Transient expression analyses of DNA extending 2.4 kb upstream of the human renin gene. *Mol Cell Endocrinol*, 1991. 80(1-3): 139-46.
133. Sambrook, J., Russel, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third ed. 2001, Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
134. Papakonstantinou, E., et al. Losartan inhibits the angiotensin II-induced modifications on fibrinolysis and matrix deposition by primary human vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001. 38(5): 715-28.

135. Nakaya, Y., et al. The phytoestrogen ginsenoside Re activates potassium channels of vascular smooth muscle cells through PI3K/Akt and nitric oxide pathways. *J Med Invest*, 2007. 54(3-4): 381-4.
136. Leskinen, M.J., et al. Mast cell chymase induces smooth muscle cell apoptosis by disrupting NF-kappaB-mediated survival signaling. *Exp Cell Res*, 2006. 312(8): 1289-98.
137. Rusinol, A.E., et al. AKT regulation of BCL family members during oxysterol-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2004. 279(2): 1392-9.
138. Ohtsu, H., et al. ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(9): e133-7.
139. Seshiah, P.N., et al. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res*, 2002. 91(5): 406-13.
140. Lin, W.N., et al. Lipopolysaccharide induces VCAM-1 expression and neutrophil adhesion to human tracheal smooth muscle cells: involvement of Src/EGFR/PI3-K/Akt pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. 228(2): 256-68.
141. Yang, X., et al. Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway. *Mol Cells*, 2005. 20(2): 263-70.
142. Jackson, E.K., Gillespie, D.G., Jackson, T.C. Phospholipase C and Src modulate angiotensin II-induced cyclic AMP production in preglomerular microvascular smooth-muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007. 49(2): 106-10.
143. Olson, E.R., et al. Angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation is mediated by protein kinase Cdelta and intracellular calcium in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension*, 2008. 51(3): 704-11.
144. Motley, E.D., et al. Insulin-induced Akt activation is inhibited by angiotensin II in the vasculature through protein kinase C-alpha. *Hypertension*, 2003. 41(3 Pt 2): 775-80.
145. Abe, K., et al. Angiotensin II-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves Gq/11, Ras, ERK, Src and Ets-1. *Hypertens Res*, 2008. 31(5): 987-98.
146. Han, Y.J., et al. Regulation of myosin light chain kinase expression by angiotensin II in hypertension. *Am J Hypertens*, 2008. 21(8): 860-5.
147. Ruiz, E., et al. Importance of intracellular angiotensin II in vascular smooth muscle cell apoptosis: inhibition by the angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan. *Eur J Pharmacol*, 2007. 567(3): 231-9.

ÖZGEÇMİŞ

Alper TOKAY, 7 Aralık 1974 yılında İstanbul’da doğdu. 1985 yılında ilköğrenimini İstanbul’da tamamladıktan sonra aynı ilde başladığı orta öğrenimini 1989 da Kuzey Kıbrıs’ın Magosa ilinde sonlandırdı. 1992 yılında Antalya’da lise eğitimini tamamladıktan sonra, aynı ilde yüksek öğrenimine devam ederek 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 1999 yılında, aynı üniversitenin Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansına başlayarak 2002 yılında master eğitimini tamamladı. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak doktora eğitimine devam etmekte, evli ve tek çocuk sahibidir. Yabancı dili İngilizcedir.